

综述与专论

分子伴娘

马青平 张志文

(北京医科大学生理教研室, 北京 100083)

提 要

许多蛋白质的多肽单体在离体条件下能折叠、组装成具有生物学功能的聚集体, 但在体内绝大多数新合成蛋白质三维结构的形成, 需要一类称为分子伴娘 (molecular chaperones) 的辅助蛋白质的存在。分子伴娘不仅为细胞生长增殖过程所必需, 而且在细胞的蛋白质合成和免疫系统抗原提呈 (antigen presentation) 作用等过程中也起着重要的调控作用。

关键词 分子伴娘, 蛋白质合成, 空间结构

一般认为蛋白质分子的三级和四级结构完全决定于多肽链氨基酸的组成和它们的序列, 也可以说一个基因产物(蛋白质)的三维结构的信息包含在相应基因的核苷酸序列中。这一称为自组装原则的概念虽受到广泛支持, 但无法解释许多实验中观察到的现象。例如在离体条件下改变蛋白质的三级和四级结构常导致无活性的聚合物形成; 有些用重组 DNA 技术在异种宿主获得高表达的蛋白质多肽没有自组装成有生物活性的蛋白质, 而是形成不溶的无活性的聚合物。由于组成蛋白质各肽链的氨基酸疏水残基或带电基团在肽链伸延、跨膜运转、折叠和聚合等一系列蛋白质生物合成过程中, 可产生瞬间随机的化学反应。这种分子内或分子间异常缔合, 很容易导致无功能聚合物形成。但奇怪的是, 正常细胞内并不出现这种无活性的聚合物。近年来研究表明, 多数新合成蛋白质在体内正确折叠和成功组装需要一种称为分子伴娘 (molecular chaperones) 或多肽结合蛋白 (polypeptide binding protein) 的辅助蛋白存

在。

1 分子伴娘的分类

Laskey 等于 1978 年在研究核小体形成时发现^[1], 一种蛋白——核质素 (nucleoplasmin) 能引导核小体的正确组装, 但最后形成的核小体中并不含有核质素。他们用 molecular chaperones (分子伴娘) 一词来描述核质素这类蛋白质的作用。

目前确认的多数分子伴娘是归类为应激蛋白的一类蛋白质, 在干扰蛋白质结构的内外因素(如热休克)诱导下产生。值得注意的是, 它们中的大多数也作为细胞基本组成部分表达, 即使在非应激的正常条件下也为细胞生存所必需。Ellis 和 Hemmingsen^[2] 将分子伴娘分为三类: 核质素、伴娘蛋白 (chaperonins) 和 Hsp70 (heat shock protein, 热激蛋白)。表 1 列举了一些分子伴娘。

表 1 分子伴侣及其可能的作用

分子伴侣	家族	功 能
糖调节蛋白	Hsp70	协助内质网内新合成的蛋白质折叠、组装和分泌
70kD 多肽结合蛋白	Hsp70	向 T 细胞的抗原提呈
73kD 多肽识别蛋白	Hsp70	将受损的蛋白导向溶酶体使其降解
酵母 Hsp70 多基因家族	Hsp70	与细胞内蛋白质向内质网和线粒体内转运有关
GroEL	GroEL	蛋白质折叠
分枝杆菌 65kD 抗原	GroEL	参与自身免疫性疾病
叶绿体 RUBISCO 结合蛋白	GroEL	RUBISCO 组装
线粒体 Hsp60	GroEL	蛋白质复合物的折叠和组装
核质素	核质素	核小体组装

2 在细胞蛋白折叠和组装中的作用

Barraclough 和 Ellis 等在研究二磷酸核酮糖羧化酶-固氧酶 (ribulose biphosphate carboxylase oxygenase, RUBISCO) 的生物合成时,发现新合成的亚基单体组装成十六多聚体全酶之前,有一种蛋白与亚基结合在一起。这种叶绿体蛋白称为 RUBISCO 结合蛋白 (RBP)^[1]。抗 RBP 抗体能阻止新合成的亚基缔合为成熟的 RUBISCO,提示 RBP 参与 RUBISCO 的组装。RBP 由 α, β 亚基各 6 个组成,分子量为 700kD^[4]。最近已从豌豆和蓖麻籽中克隆出 α 亚单位的 cDNA,由核苷酸序列推出的一级结构和大肠杆菌的 GroEL 蛋白具有很高的同源性 (47%)^[5]。大肠杆菌 GroEL 和 GroES 基因构成 GroE 操纵子,而后者是热休克蛋白基因调节子的组成部分。噬菌体 α 和 T4 头的组装需要 GroEL 和 GroES 蛋白存在^[6]。

鉴于 GroEL 和 RBP 在结构和功能上的明显相似性, Hemmingsen 等^[7]将具有催化蛋白组装作用的这一类分子伴侣称为伴侣蛋白 (chaperonin)。McMullin 和 Hallberg 也分离

出梨状四膜虫中一种由热诱导产生的线粒体蛋白,其结构与大肠杆菌 GroEL 蛋白及 RBP 一样,由两个各由七个亚基组成的环构成。抗该蛋白的抗体与植物、人类、酵母和爪蟾的应激蛋白有交叉反应^[7]。

此外,酵母 mif4 (MIF4 基因缺陷)突变株的实验资料有助于说明分子伴侣的作用。该变种酵母因线粒体蛋白组装缺陷,对温度升高极为敏感,当超过 42℃ 可导致死亡。在不利于生存的温度下, mif4 酵母的线粒体前体蛋白仍可进入线粒体,并被蛋白水解酶加工处理,但不能组装成有活性的寡聚体蛋白质^[8]。MIF4 基因已被克隆,序列测定表明它与编码线粒体蛋白的酵母 Hsp60 基因是同一基因,与大肠杆菌 GroEL 蛋白和植物 RBP 的同源性分别为 50% 和 40%。同时,编码哺乳类 GroEL 蛋白的 cDNA 已分别从人、中国仓鼠的细胞中克隆出来,与酵母 Hsp60 和大肠杆菌 GroEL 蛋白有 50% 的同源性^[9]。这些结果表明,证明 GroEL 类似物 (也称 Hsp60 蛋白) 确实组成一个广泛的蛋白质家族^[7]。

3 伴侣蛋白的作用机制

Ostermann 等^[10]通过研究一种融合蛋白—前 Su9-DHFR 的折叠过程,基本阐明了伴侣蛋白的作用方式。前 Su9-DHFR 是将胞浆的二氢叶酸还原酶 (dihydrofolate reductase, DHFR) 的基因与编码链孢菌线粒体的 F_1, F_0 -ATP 酶 F_0 亚单位的第 9 亚基前体 DNA 连接后表达的融合蛋白,它首先与 Hsp60 结合成对蛋白酶敏感的复合物,同时激活 ATP 酶水解 ATP,此过程释放的能量用于融合蛋白从 Hsp60 解离,随后游离的融合蛋白经线粒体膜相应受体介导进入线粒体,再次与 Hsp60 结合、解离,最后折叠成具有生物学功能的蛋白质。

用具有透膜作用的 N-ethylmaleimide (乙基顺丁烯二酰亚胺) 预先处理线粒体,耗竭其 ATP,前体蛋白仍能进入线粒体,但往往与 Hsp60 形成复合物堆积起来。加入 ATP 后,折叠的前体蛋白可从 Hsp60 解离,形成不溶性聚

合物。这种聚合物对蛋白酶高度敏感。这一现象说明蛋白质处于不正确的折叠形式,同时也提示蛋白质正确折叠尚需一种未知的催化因子存在^[11]。Goloubinoff 等^[12]进一步发现大肠杆菌 GroEL, GroES 蛋白促进红螺菌 RUBISCO 翻译后组装过程。在纯化的 GroEL 和 GroES 蛋白和 ATP 的使用下,未折叠的红螺菌 RUBISCO 无活性多肽在体外可以重构为具有催化作用的 RUBISCO 二聚体。在折叠过程中, RUBISCO 要先转变为一种不稳定的中间产物, GroEL 蛋白与这一中间产物结合可阻止它形成聚合物。RUBISCO 亚基单体从 GroEL 蛋白上解离必须有 ATP 的存在,不能水解的 ATP 衍生物和 dATP 不能支持伴娘蛋白介导的 RUBISCO 重构。这些结果提示伴娘蛋白作用于组装前单体的折叠,组装过程本身并不依赖伴娘蛋白。

蛋白质体内折叠在多大程度上依赖伴娘蛋白还不清楚,近年的资料表明蛋白质在细胞内折叠需要伴娘蛋白可能是个规律。Lubben 等^[13]发现 9 种蛋白进入叶绿体后有 7 种与 RBP 形成可检测的复合物。Van Dyk^[14]等观察到多拷贝 GroEL 操纵子抑制编码许多无关蛋白的基因突变; Beckman 等^[15]进一步发现, HeLa 细胞中大多数蛋白质与共同翻译的另一类分子伴娘 (Hsp70) 短暂结合。

4 作用的特异性

分子伴娘似乎不与已折叠的天然状态的蛋白质相互作用,说明伴娘蛋白不能接触它所识别的结构要素或后者不含有被伴娘蛋白识别的结构成分。RUBISCO 与 RBP 的结合不被较高浓度的非离子去污剂或 1mol/L NaCl 阻断,因此可以推测伴娘蛋白与其底物的结合不是通过简单的疏水键或离子键。最近的资料表明,参与菌毛形成的一种伴娘蛋白的结构与免疫球蛋白的一个区相似^[16],这一发现支持伴娘蛋白识别特定结构的观点。

迄今为止,有关分子伴娘与靶蛋白结合条件的研究主要是在 Hsp 70 家族进行的^[17]。

Hsp70 属于 ATP 结合蛋白,在蛋白移位中的主要作用是打开前体蛋白的折叠 (unfold) 并维持它处于非折叠状态。Hsp70 的两个成员可与许多短合成肽反应,能与多数亲水肽链牢固结合。浓度为 mmol/L 水平的 ATP 能促进结合肽的释放,但 1mol/L NaCl 和不能水解的 ATP 衍生物无作用。这两种 Hsp70 蛋白具有明显的 ATP 酶活性,其活性的高低亦取决于与其结合肽的氨基酸序列。这一活性可用于测定单个肽对这两种分子伴娘的亲性和。随机选取的多肽亲和力变化至少为 1000 倍以上(即高亲和力的多肽为低亲和力多肽的 1000 倍以上)。ATP 水解的 V_{max} 相对恒定,而其 K_m 值在 10 μ mol/L 到 10mmol/L 之间,因此 Hsp 70 类似物与不同肽结合后的解离在同一生理条件下是不同的。Flynn 指出^[17],各个肽段与伴娘蛋白的亲合力差别较大,两者的解离是有顺序地逐步进行,这就保证了新合成的蛋白质中各肽段按特定的折叠路径进行。

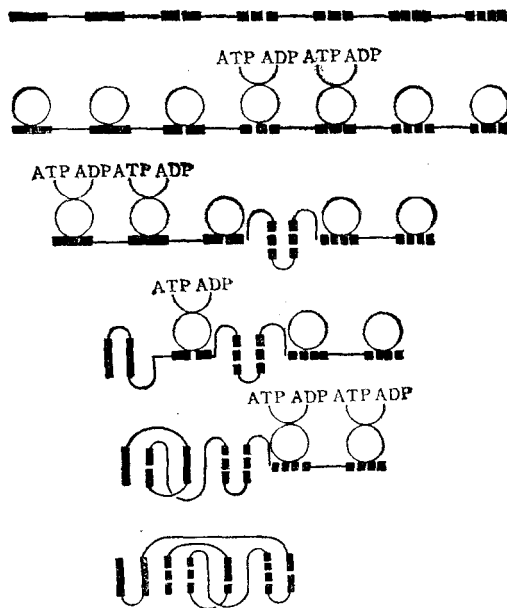


图 1 分子伴娘介导多肽折叠的可能机制示意图

圆圈代表热休克蛋白 (Hsp), 不同的粗线代表多肽链上与分子伴娘具有不同亲和力的结合点

图 1 为伴娘蛋白介导的折叠路径的简化模型。新翻译的多肽产物与许多分子伴娘结合,

结合的分子伴侣具有 ATP 酶活性, 其活性决定于靶肽的结构。这些功能特点导致多肽链仅按一种或少数几种方式折叠。缺乏分子伴侣可能导致无活性聚合物形成^[18]。需要注意的是, 处于分裂中的真核细胞新合成多肽的浓度约为 50 $\mu\text{mol/L}$, 平均合成时间在 1—5 min 之间; Hsp70 的 ATP 酶活性转换率较低, 约为 0.2 min, 保证了伴侣蛋白直到整条多肽合成后仍能与其结合。缺乏伴侣蛋白或过早的解离均可引致不可逆聚集物的形成^[19]。

总之, 分子伴侣具有双重作用: 第一, 抑制新合成(包括运转中的)蛋白质的折叠, 减少产生不溶性聚集物的危险性; 第二, 通过靶蛋白从伴侣蛋白上有序的解离仅仅允许若干可能的折叠路径中的一个进行, 使靶蛋白正确折叠。伴侣蛋白有序的释放取决于新合成靶蛋白的一级结构, 换句话说, 决定蛋白空间结构仍然是多肽的一级结构, 只不过在蛋白质三级、四级结构的形成过程中需要分子伴侣的参与。天然的和未折叠状态蛋白分子之间吉布斯自由能差别很小(—40 kJ/mol), 因此, 分子伴侣-蛋白复合物解离过程中水解 ATP 将提供足够的能量以完成蛋白构型的改变^[19]。

5 作用范围和应用价值

伴侣蛋白除在蛋白质生物合成中起重要作用外, 还参与多种细胞功能的调控。最近发现某些 Hsp70 蛋白可被磷酸化, 并具有与钙调蛋白结合的位点。Hsp90 蛋白可与糖皮质激素受体、IgG 重链、某些分泌蛋白、微管 DNA 复制复合物等发生作用。Van Buskirk 等^[20]最近发现一种与 Hsp70 家族有关的分子量 72—73 kD 的多肽结合蛋白在抗原提呈 (antigen presentation) 中有重要作用, 抗这一蛋白的抗体可阻断细胞色素 C 抗原向细胞色素 c 特异 T 细胞杂交株的提呈。人类主要组织相容性复合物(MHC) 中亦含有编码 Hsp70 蛋白的基因。在巨噬细胞的抗原提呈作用中, 抗原必须与巨噬细胞的 MHC 类型相符合才能被提呈。因此, 上述资料提示在多肽抗原的抗原提呈过程

中, 伴侣蛋白可能与多肽抗原或变性蛋白结合, 从而促进它们与主要组织相容性复合物分子的结合。

因为伴侣蛋白对许多蛋白质的在细胞内折叠至关重要, 所以在异种表达系统中让蛋白与其伴侣蛋白共同表达可能会减少其不正确折叠。尽管不同种属的分子伴侣之间的氨基酸序列有相当高的同源性, 分子伴侣跟与其结合的多肽在种属来源上越接近, 其在体外帮助完全变性蛋白重新折叠的能力就越强。可以设想, 某种蛋白若以聚合物形式合成出来, 可用强变性剂使其成为一种随机螺旋状态而被溶解, 然后去除变性条件并加入伴侣蛋白和 ATP 使其正确折叠, 即可得到高度纯化和有活性的蛋白质产物。借助伴侣蛋白在体外重组有活性 RUBISCO 的成功, 展示了这一设想的前景: 由蛋白质合成仪和伴侣蛋白加样器组成的全自动体外蛋白质合成仪, 将如同用 DNA 聚合酶链式反应体外合成扩增 DNA 一样, 大量生产出具有生物学活性的各种临床诊治急需的酶、生长因子和蛋白质激素。

本文经北京医科大学生化教研室周爱儒教授审阅, 特致谢意。

参 考 文 献

- 1 Laskey R A *et al.* *Nature*, 1978; 275: 416
- 2 Ellis R J *et al.* *Trends Biochem Sci*, 1989; 14: 339
- 3 Barraclough R *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1980; 608: 19
- 4 Roy H. *Plant Cell*, 1989; 1: 1035
- 5 Hemmingsen S M *et al.* *Nature*, 1988; 333: 330
- 6 Sternberg N. *J Mol Biol*, 1973; 76: 25
- 7 McMullin T W *et al.* *Mol Cell Biol*, 1988; 8: 371
- 8 Cheng M Y *et al.* *Nature*, 1989; 337: 620
- 9 Jindal S *et al.* *Mol Cell Biol*, 1988; 9: 2279
- 10 Osterman J *et al.* *Nature*, 1989; 341: 125
- 11 Leustek T *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 7805
- 12 Colubini P *et al.* *Nature*, 1989; 337: 44
- 13 Lubben T H *et al.* *Plant Cell*, 1989; 1: 1223
- 14 Van Dyk T K *et al.* *Nature*, 1989; 342: 451
- 15 Beckman R P *et al.* *Science*, 1990; 248: 850
- 16 Holmgren A *et al.* *Nature*, 1989; 342: 248
- 17 Flynn G C *et al.* *Science*, 1989; 245: 385
- 18 Wetlaufer D B. *Biopolymers*, 1985; 24: 251
- 19 Fischer G *et al.* *Biochemistry*, 1990; 29: 2206
- 20 Vanbuskirk A *et al.* *J Exp Med*, 1989; 170: 1799