

综述与专论

分子伴侣的多重功能

俞峻 马康涛 张迺薇

(北京医科大学生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

摘要 分子伴侣 (molecular chaperone) 在原核生物和真核生物的细胞中广泛存在. 分子伴侣可稳定未折叠或部分折叠的多肽, 并防止不适当的多肽链内或链间相互作用; 有些分子伴侣也可与天然构象的蛋白质相互作用以促使寡聚态蛋白质发生结构重排. 基于分子伴侣能识别并调节细胞内多肽的折叠, 因此它们还具有介导线粒体蛋白跨膜转运, 调控信息传导通路和转录、复制, 以及参与微管形成与修复等功能.

关键词 分子伴侣, 跨膜转运, 信息传递, 微管形成

学科分类号 Q516

Lasky 于 1978 年首先提出了分子伴侣的概念, 这一概念目前已延伸到许多蛋白质, 它们可介导蛋白质正确的折叠与装配, 但并不构成被介导的蛋白质的组成部分. 现已鉴别出来

的分子伴侣主要属于以下几类高度保守的蛋白质家族, 其成员广泛分布于原核生物及真核生物细胞中^[1].

表 1 分子伴侣家族

	原核生物			真核生物					
	大肠杆菌			酵母		果蝇	哺乳动物		植物
	胞质	内质网	线粒体	胞质	胞质	胞质	内质网	线粒体	内质网 线粒体
伴侣素 60 家族 (chaperonin-60 family)	GroEL			Hsp60 (Mif4p)				Hsp60 (Hsp58)	RuSBP
应激蛋白 70 家族 (stress-70 protein family)	Dnak	Ssa1-40	Kar2p (Bip)	Ssc1p	Hsp68 Hsp70 Hsc1 Hsc2 Hsc4	Hsp70 (p73) Hsc70 (p72, CUATPase, Prp73)	Bip (Grp78)	Hsp70 (Grp75)	b70 (Bip)
应激蛋白 90 家族 (stress-90 protein family)	HtpG (C62.5)	Hsp83 Hsc83			Hsp83	Hsp90 (Hsp83 Hsp87)	Grp94 (Erp99 endoplasmic)		

除表 1 中所列三类分子伴侣外, 还有一些分子伴侣各有特点, 并不广泛存在于所有生物, 不归为应激蛋白家族, 包括核质素、TRAP (P28, 为内质网的 T 细胞受体相关蛋白)、大肠杆菌 SecB 等。

分子伴侣能够识别并调节细胞内多肽的折叠, 基于这一特性, 分子伴侣除了能介导新生肽链的折叠、装配这一广为人知的功能外, 还具有介导线粒体蛋白跨膜转运、调控信息传递通路和转录复制、参与微管形成与修复等多重功能。

1 分子伴侣介导线粒体蛋白跨膜转运

在细胞质中合成的线粒体蛋白质必须穿越线粒体膜到达其行使功能的部位。跨膜转运 (translocation) 过程是单向进行的。完成这一单向转运过程需要分子伴侣, 它们能解开细胞质内前体蛋白 (precursor) 折叠的结构域, 牵拉多肽链穿膜而过, 最后再帮助已进入基质的肽链重新折叠。

1.1 前体蛋白在线粒体外去折叠

前体蛋白不能以折叠构象进行跨膜转运, 只能以伸展的肽链形式通过线粒体膜。研究表明胞质中的前体蛋白通常不紧密折叠, 并因此对蛋白酶的消化极为敏感。某些蛋白质虽紧密折叠, 但紧密折叠的结构域至少在某些情况下会影响蛋白质转运的效率^[2]。因此在转运时前体蛋白必须在线粒体外膜外面打开, 或者保持松弛状态且防止松弛状态的蛋白质聚集 (aggregation)。

胞质 Hsp70s 家族成员 (ct-Hsp70) 可与前体蛋白相互作用, 防止前体蛋白形成不可解开的构象, 也可以防止已松弛的前体蛋白聚集。在体外情况下去除 ct-Hsp70 将导致线粒体 F₁-ATPase β 亚基前体在胞质中聚积。另有人发现除 ct-Hsp70s 外, 还有一种细菌 DnaJ 的同源分子 YDJ1 在高温应激状态下发挥同样的作用^[3,4]。

前体蛋白与一种叫线粒体输入刺激因子 (mitochondrial import stimulating factor, MSF)

的胞质分子伴侣形成复合物后, 再与线粒体膜上的输入受体 (import receptor) 结合, 并最终进入线粒体外膜的输入通道^[5]。

1.2 多肽链穿越线粒体膜

线粒体基质 Hsp70 (mHsp70) 可与进入线粒体腔的前导肽链 (precursor chain) 交联, 提示 mHsp70 直接参与蛋白质转运。Simon 等^[6]提出一种作用机制——布朗棘轮模型 (Brownian ratchet model)。该模型认为在蛋白质转运孔道内, 多肽链做布朗运动摇摆不定, 一旦前导肽链自发进入线粒体腔, 立即有一分子 mHsp70 结合上去, 这样就防止了前导肽链退回细胞质。随着肽链进一步伸入线粒体腔, 肽链会结合更多的 mHsp70 分子。根据该模型可以预测一条折叠肽链的转运应不快于它的自发解链。许多蛋白质的自发解链极慢, 如细胞色素 b₂, 其速度常以小时计, 但细胞色素 b₂ 可在几分钟内进入线粒体。对这种快速转运的发生最直接的解释是 mHsp70 可拖拽前导肽链。要拖拽肽链, mHsp70 必须同时附着在肽链和线粒体膜上。这样的排列方式使 mHsp70 通过改变构象即可产生拖力。首先 mHsp70 以一种高能构象结合前导肽链, 然后松弛为一种低能构象, 促使前导肽链进入, 并迫使后面的肽链解链以进入转运孔道。这种假说将 mHsp70 描绘为转运发动机, 类似于肌球蛋白和驱动蛋白 (kinesin) 的牵拉作用。

许多实验为“转运发动机”假说提供了依据。有人发现 mHsp70 与线粒体内膜蛋白 ISP45 或 MIM44 形成复合物, 酵母内质网 Kar2p 分子 (Hsp70 家族成员) 与跨膜蛋白 Sec63p 联结。Kar2p-Sec63p 和 mHsp70-ISP45 复合物在 ADP 存在时稳定, 加入非水解性 ATP 类似物则解聚, 这也符合 Hsp70 蛋白依赖 ATP 进行结合、释放多肽链循环的特性^[7,8]。

1.3 多肽链在线粒体基质内重新折叠

蛋白质跨膜转运至线粒体基质后必须折叠为天然构象以行使功能。免疫共沉淀实验表明基质内 Hsp60 参与该过程。mHsp60 介导的蛋

白质折叠依赖 ATP 且需要另一种分子伴侣 Hsp10 的辅助. Rowley 等发现 MDJ1 (线粒体 DnaJ, 在酵母中称为 MDJ1) 在正常温度下对蛋白质折叠不是必要的, 但在高温应激时则不可或缺.

2 分子伴侣调节信息传递通路

越来越多的细胞内信息传递分子被发现与细胞蛋白质折叠机制有关, 信息传递分子的折叠、装配、解聚或构象改变决定它们处于活性域或非活性状态. 因此蛋白质折叠机制的重要成分——分子伴侣能调节许多激酶、受体和转录因子的活性^[9].

2.1 对激酶和激酶受体信息传递的调节

对果蝇的研究表明 Hsp90 与酪氨酸激酶受体 sevenless 和 torso 介导的信息传递有关, Hsp90 基因产物若减少一半, 将损害 sevenless 和 torso 介导的信息传递级联反应, 甚至使其完全丧失信息传递功能.

酪蛋白激酶 II (CKII) 在细胞生长和细胞周期中起作用, eIF-2 α 激酶对于调节蛋白质合成至关重要. 据报道这两种激酶均能与 Hsp90 及其他分子伴侣结合形成复合物, 而且 CKII 和 eIF-2 α 激酶的活性对 Hsp90 有剂量依赖关系.

2.2 对类固醇激素信息传递的调节

类固醇激素的受体都含有 DNA 结合域和激素配体结合域, 处于非活性状态时, 它们与由分子伴侣和 PPIase 组成的 9 S~10 S 大颗粒形成复合物. 一般每个类固醇受体单体结合一个 Hsp90 二聚体. 类固醇激素受体被激活时, 则与 Hsp90 分离获得结合 DNA 的能力. 有趣的是, 即使没有配体存在, 仅用加热或改变盐浓度的方法使受体与 Hsp90 分离即可激活受体^[10]. 就上述现象而言, Hsp90 起抑制受体活性的作用. Yamanoto 等^[11]用实验证实 Hsp90 也能激活受体. 他们发现雌激素和糖皮质激素通过其各自受体诱导 β -半乳糖苷酶报告基因表达的能力极端依赖 Hsp90.

2.3 对复制、转录的调节

分子伴侣可以通过调节蛋白寡聚状态来调

节转录因子和 DNA 结合蛋白的活性. 例如在 λ 噬菌体 DNA 复制中, repA 只在单体形式时有活性, 而它从寡聚体到单体的过渡由细菌分子伴侣 DnaK 和 DnaJ 调控, 又如在真核细胞热休克反应中, 反应活性涉及到一种同源三聚体的形成, 其间又有 Hsp70 的参与.

分子伴侣调控复制、转录方面的例子很多. 例如, 大肠杆菌热休克反应处于 δ^{32} 转录因子的正性调控下, 而 DnaK 和 DnaJ 在转录水平上对热休克反应起负性调控作用. 在 ATP 存在时 DnaK 水解 ATP 并高效结合 δ^{32} , 形成 DnaK-DnaJ- δ^{32} -ADP 复合物. DnaK 和 DnaJ 通过与 DNA 聚合酶竞争结合 δ^{32} 抑制基因转录^[12]. GrpE 可结合该复合物并促使核苷酸释放和复合物解离, 从而又负性调节 DnaK 和 DnaJ 的转录抑制作用^[13]. 通过与 DnaK、DnaJ 暂时结合从而对 δ^{32} 活性进行可逆性抑制是热休克反应的一个重要调控手段. 又如, Mu 噬菌体 DNA 复制起始需要 *E. coli* 的一种分子伴侣 ClpX 蛋白调节^[14].

由于分子伴侣对细胞内蛋白质合成和装配的重要性, 在细胞核内发现众多的分子伴侣自然引起了人们极大的兴趣. 现已知转录因子与靶 DNA 结合时会发生重要的构象变化, 而分子伴侣无疑在其中扮演重要的角色. 它们可在适宜的转录因子-转录因子或转录因子-DNA 复合物形成时起开关的作用, 保证转录因子-转录因子或转录因子-DNA 复合物形成于正确的时间和正确的地点, 以对信息作出正确的反应.

3 分子伴侣参与微管形成与修复

早期的遗传学实验表明 TCP-1 与细胞骨架尤其是微管系统有关^[15]. 近几年研究证实包括 TCP-1 在内的伴侣素可辅助新合成的肌动蛋白和微管蛋白的折叠^[16]. 鉴于中心体是微管生长的起始部位, Brown 及其同事们将注意力集中于中心体上. 他们证明 Hsp73 和 TCP-1 是中心体的组成成分, 同时发现抗 TCP-1 抗体阻断微管从中心体的再生. 表面上

看, 似乎是抗 TCP-1 抗体抑制了某些蛋白的成熟而阻断微管再生, 但许多实验否决了这种可能. 首先, 蛋白合成抑制剂 cycloheximide 对微管再生并无影响; 其次, 充斥着非离子去污剂的细胞仍能从中心体再生微管; 最后, 只要提供能量, 至少在体外 6 S 微管蛋白可自行组装为微管. 也许后者就蕴藏着问题的答案: TCP-1 作为分子伴侣辅助微管蛋白的正确折叠与装配^[17].

Brown 等^[18]对中心体的进一步研究发现细胞热休克反应后中心体的结构、功能的复原依赖 Hsp73 的水平. 微注射抗 Hsp73 抗体可阻断热休克反应后中心体的重新装配及微管再生. 在热休克之前微注射纯 Hsp73 蛋白则可加快中心体的复原. 热休克处理可导致细胞发生许多变化, 例如, 呼吸抑制、细胞周期进程延迟、细胞骨架有机成分改变等. 有人认为上述的细胞变化实际上是原细胞各功能复合物中蛋白质成分热变性、失活的结果, 而热应激时生成的热休克蛋白就是用来修复或取代那些失活的蛋白质成分的. 现在许多热休克蛋白被证实为分子伴侣的事实为这种推测提供了有力的证据. 更能说明问题的是应激蛋白的水平与细胞热休克后功能的恢复能力成正相关.

自从分子伴侣被确认以来, 人们发现几乎细胞代谢的所有过程——其中或多或少总有蛋白质参与——都有分子伴侣发挥作用. 新的分子伴侣仍在不断地被发现, 也许某些人们现在不能解释的生命科学难题将由于对分子伴侣的深入了解而产生合理的答案. 目前主要的研究方向是阐明分子伴侣行使各种功能的特异机制. 随着研究工作的深入, 分子伴侣会越来越受到人们的重视.

参 考 文 献

- Gething M J, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature*, 1992, **355** (6355): 33~ 45
- Vestweber D, Schatz G. Point mutations destabilizing a precursor protein enhance its post-translational import into mitochondria. *EMBO J*, 1988, **7** (4): 1147~ 1151
- Caplan A J, Cyr D M, Douglas M G. YDJ1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. *Cell*, 1992, **71** (7): 1143~ 1155
- Cyr D M. Cooperation of the molecular chaperone Ydj1 with specific Hsp70 homologs to suppress protein aggregation. *FEBS Lett*, 1995, **359**: 129~ 132
- Hachiya N, Mihara K, Suda K *et al.* Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import. *Nature*, 1995, **376** (6543): 705~ 709
- Simon S M, Peskin C S, Oster C F. What drives the translocation of proteins? *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (9): 3770~ 3774
- Kronidou N G, Oppliger W, Bolliger L *et al.* Dynamic interaction between Isp45 and mitochondrial hsp70 in the protein import system of the yeast mitochondrial inner membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (26): 12818~ 12822
- Rassow J, Maarse A C, Krainer E *et al.* Mitochondrial protein import: Biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *J Cell Biol*, 1994, **127** (6): 1547~ 1556
- Rutherford S L, Zuker C S. Protein folding and the regulation of signaling pathways. *Cell*, 1994, **79** (7): 1129~ 1132
- Willmann T, Beato M. Steroid-free glucocorticoid receptor binds specifically to mouse mammary tumor virus DNA. *Nature*, 1986, **324** (6098): 688~ 691
- Antonsson C, Whitelaw M L, McGuire J *et al.* Distinct roles of the molecular chaperone hsp90 in modulating dioxin receptor function via the basic helix-loop-helix and PAS domains. *Mol Cell Biol*, 1995, **15** (2): 756~ 765
- Liberek K, Wall D, Georgopoulos C. The DnaJ chaperone catalytically activates the DnaK chaperone to preferentially bind the δ^{32} heat shock transcriptional regulatory regulator. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (14): 6224~ 6228
- Gamer J, Multhaupt G, Tomoyasu T *et al.* A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates activity of the *Escherichia coli* heat shock transcription factor δ^{32} . *EMBO J*, 1996, **15**: 607~ 617
- Krukltis R, Welty D J, Nakai H. ClpX protein of *Escherichia coli* activates bacteriophage Mu transposase in the strand transfer complex for initiation of Mu DNA synthesis. *EMBO J*, 1996, **15**: 935~ 944
- Perret E, Moudjou M, Geraud M L *et al.* Identification of an Hsp70-related protein associated with the centrosome from dinoflagellates to human cells. *J Cell Sci*, 1995, **108**: 711~ 725
- Sternlicht H, Farr G W, Sternlicht M L *et al.* The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (20): 9422~ 9426
- Brown C R, Doxsey S J, Hong-Brown L Q *et al.* Molecular chaperones and the centrosome. *J Biol Chem*, 1996, **271** (2): 824~ 832
- Brown C R, Hong-brown L Q, Doxsey S J *et al.* Molecular chaperones and the centrosome. *J Biol Chem*, 1996, **271** (2): 833~ 840

The Multiple Functions of Molecular Chaperones. YU Jun, MA Kang-tao, ZHANG Nai-heng (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract The members of the molecular chaperone families are widely distributed from prokaryotes to eukaryotic cells. The molecular chaperones function *in vivo* to recognize and stabilize unfolded or partially folded polypeptides, and protect polypeptides from inappropriate intra- or interchain interaction. In some circumstances,

the chaperones interact with native proteins and promote rearrangement of oligomeric complexes. Stemming from their ability to recognize and modulate the state of folding of polypeptides within cells, the molecular chaperones serve many functions including mediating mitochondrial protein translocation, regulating signal pathway and being involved in microtubule nucleation.

Key words molecular chaperone, protein translocation, signal pathway, microtubule nucleation

细胞周期的关卡调控途径研究进展

张平波 洪锡钧 刘 堰

(西南师范大学生命科学系, 重庆 400715)

摘要 目前已从不同物种、不同种类细胞中筛选到很多关卡基因和蛋白质, 如 ATM、RAD53、CHK1 等. 有关它们在具体关卡调控途径中的作用, 以及和癌变发生的关系已有许多报道.

关键词 细胞周期, 关卡调控途径, 细胞癌变

学科分类号 Q28

细胞周期是指连续分裂的细胞从一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂完成所经历的整个序贯过程. 在这一过程中, 遗传物质复制, 各组分加倍, 然后平均分配到两个子细胞中. 细胞周期的概念最早于 50 年代由 Howard 和 Pelc 等提出, 并将细胞周期划分为四个时期: G1 期 (DNA 合成准备期) 和 S 期 (DNA 合成期)、G2 期 (有丝分裂准备期) 及 M 期 (有丝分裂期). 细胞在细胞周期中顺序经过 G1 → S → G2 → M 而完成其增殖. 早期对细胞周期各时相具体的形态变化和生化事件已有详细的研究, 尤其是发现了有丝分裂的成熟促进因子 (maturation promoting factor, MPF)、周期蛋白 (cyclin) 和细胞分裂周期 (cell division cycle) 基因等, 掀起了从基因水平、分子水平

研究细胞周期的调控机制的热潮. 80 年代末, Murray 和 Hartwell 等^[1,2] 研究了细胞周期中按时序发生的各事件的相互依赖关系后, 提出细胞周期的关卡调控 (checkpoints control) 的概念. 这种关卡调控的功能是保证细胞周期在上游事件正确完成的前提下才启动下游事件.

1 关卡调控研究的材料及方法

两栖类、软体动物等的卵母细胞和早期胚胎, 哺乳动物的躯体细胞, 低等真核细胞酵母等是研究细胞周期关卡调控的最常用的材料. 目前用辐射 (紫外线、γ 射线) 或 DNA 烷化剂处理分裂细胞造成 DNA 损伤或阻断 DNA

收稿日期: 1996-12-11, 修回日期: 1997-06-06