

结核杆菌小分子热休克蛋白 Hsp16.3 的高效自发再折叠和再组装*

毛启龙 冯修光 吕增益**

(清华大学生物科学与技术系, 蛋白质科学教育部重点实验室, 北京 100084)

摘要 来自结核杆菌的小分子热休克蛋白 Hsp16.3 以九聚体的形式存在. 用三种不同的强变性条件 (100℃加热 15 min, 12 mol/L 脲或 8 mol/L 盐酸胍处理 4 h) 将 Hsp16.3 变性, 然后通过冷却或透析使之复性, 并利用孔径梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳和圆二色性光谱比较了变性-复性前后 Hsp16.3 的各个层次高级结构. 结果显示, 变性的 Hsp16.3 几乎可以完全恢复至天然构象, 这表明小分子热休克蛋白 Hsp16.3 具有很强的自发折叠和组装能力.

关键词 热休克蛋白, 变性, 复性, 再折叠, 再组装

学科分类号 Q512

全世界每年都有三百多万人死于结核病^[1]. 结核杆菌是引发这类疾病的元凶. 由于结核杆菌能够长达数十年地潜伏在巨噬细胞中, 所以结核病难以根治. 研究表明, 当结核杆菌在巨噬细胞中潜伏的时候, 存在于细胞质膜上的主要抗原 Hsp16.3 会大量表达^[2]. 最近的报道表明, 缺氧条件下结核杆菌的细胞壁增厚, Hsp16.3 的表达量增加^[3]. 另一方面, 基因敲除实验表明如果没有 Hsp16.3, 结核杆菌将难以在巨噬细胞中存活^[4]. 因此, 对 Hsp16.3 的研究将有助于深入了解结核杆菌在人体中长期潜伏的机制.

通过氨基酸序列的同源性比较, Hsp16.3 被认为是小分子热休克蛋白家族的成员^[5]. 这个家族具有以下一些共同特征: 靠近 C 端有一段长约 80 ~ 100 个氨基酸的“ α -crystallin”结构域, 这个结构域比较保守; 二级结构以 β 折叠为主; 单亚基较小 (12~43 ku); 形成寡聚体 (由 9~40 个亚基组成)^[6]. 后来的研究发现 Hsp16.3 具有抑制其他底物蛋白聚集的能力, 即分子伴侣活性^[7,8]. 结构上, Hsp16.3 被认为是由三个三聚体组成的九聚体^[7]. 本实验室以前的研究发现 Hsp16.3 在高达 85℃ 的条件下处理 3 h 而不会失活^[8]. 在本篇论文中, 我们对 Hsp16.3 进行了变性-复性研究, 发现变性的 Hsp16.3 几乎可以完全恢复至天然构象, 说明小分子热休克蛋白 Hsp16.3 具有很强的自发折叠和组装能力.

1 材料与方法

1.1 Hsp16.3 的表达和纯化

将含有 Hsp16.3 基因的 pET-9d (Novagen 公

司) 质粒转入到大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中进行表达. Hsp16.3 的具体纯化步骤参照文献 [7], 但不用加诱导剂 IPTG. 纯化的 Hsp16.3 通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 检测纯度达到 99% 以上. 蛋白质浓度用 Biorad 方法以及紫外光吸收法测定.

1.2 Hsp16.3 的变性与复性

纯化的 Hsp16.3 样品溶于 50 mmol/L Na_3PO_4 (pH 7.0) 中. 热处理: 在 100℃ 下温浴 15 min 后, 置于冰上, 立即冷却. 化学处理: 将 Hsp16.3 溶于 12 mol/L 脲或 8 mol/L 盐酸胍中, 37℃ 温浴 4 h, 然后在 200 倍体积的缓冲液中透析 12 h, 除去变性剂.

1.3 圆二色性光谱

远紫外和近紫外 CD 光谱的测量在一台接有恒温水浴循环控制仪 (Pharmacia 公司) 的 Jasco J-715 分光偏振计上进行. 每条曲线是 15 次测量的平均. 测量光径为 2 mm. 所用蛋白质终浓度为 0.4 g/L (远紫外) 或 4 g/L (近紫外). 缓冲液为 50 mmol/L Na_3PO_4 , pH 7.0. 样品先在预定的温度温浴 15 min, 然后在调好温度的测量室测量.

1.4 孔径梯度非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

孔径梯度 (4% ~ 30%) 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳按 Ausubel 等^[9]描述的方法进行. 电泳使用

* 国家重点基础科学研究基金 (G1999075607) 和杰出青年科学基金资助项目 (39725008).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62772251, E-mail: changzy@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2001-04-17, 接受日期: 2001-06-05

Tris-甘氨酸缓冲系统, 类似 SDS-聚丙烯酰胺电泳配制过程, 但不含 SDS, 样品直接用不含 SDS 的上样缓冲液上样电泳. 用牛血清白蛋白作为参照. 孔径梯度非变性聚丙烯酰胺电泳在 25℃ 下进行 (24 h), 利用一台恒温水浴循环控制器连通电泳槽以控制电泳时温度. 凝胶用考马斯亮蓝染色并脱色至显示清晰的蛋白质带.

2 结果

2.1 复性后 Hsp16.3 恢复九聚体结构

Hsp16.3 亚基的大小为 16.3 ku. 以前的研究表明 Hsp16.3 是以九聚体的形式存在, 分子质量约为 144 ku. 我们利用非变性孔径梯度凝胶电泳来比较复性前后 Hsp16.3 的寡聚体大小. 结果显示, 未处理的天然 Hsp16.3 蛋白和经过变性-复性处理过的 Hsp16.3 蛋白在凝胶中的电泳行为基本相同 (图 1 中 2~5). 它们的主带在同一位置, 略高于牛血清白蛋白二聚体的带 (图 1 中 1). 牛血清白蛋白二聚体的分子质量是 134 ku, 说明复性后的 Hsp16.3 完全恢复至九聚体.

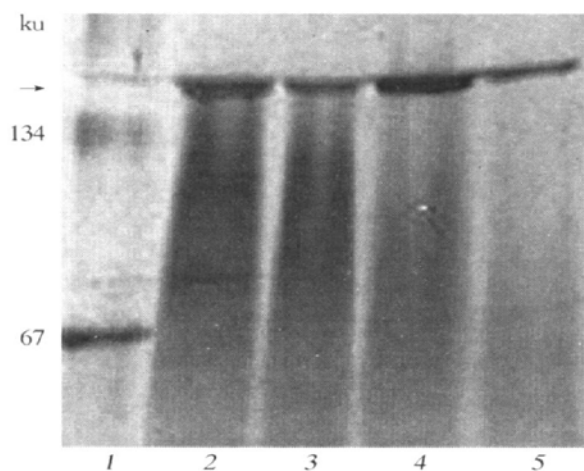


Fig. 1 Native pore gradient gel electrophoresis (4%~30% acrylamide) of Hsp16.3

1: Bovine serum albumin (BSA); 2: native Hsp16.3; 3~5: renatured Hsp16.3 proteins from denaturation by urea, guanidine and heat respectively.

2.2 Hsp16.3 复性后二级结构的恢复

小分子热休克蛋白家族成员的一个典型特征就是其二级结构基本上是 β 折叠. 这种结构在远紫外 CD 光谱上显示其最低峰在 217 nm 处 (图 2 中 1). 远紫外 CD 光谱的比较结果表明, 在各种变性条件下 (包括脲变性, 盐酸胍变性或热变性), Hsp16.3 的远紫外 CD 光谱发生了很大改变, 已经

不是以 β 折叠为主的特征光谱 (图 2 中 2~4). 这表明变性条件导致了 Hsp16.3 天然二级结构的丧失. 但是, 各种变性条件处理后的 Hsp16.3 的远紫外 CD 光谱基本都与未处理的没有显著差异 (图 2 中 5~7). 这意味着小分子热休克蛋白 Hsp16.3 的二级结构在各种变性条件下发生的变化是完全可逆的. 它们可以在除去变性条件之后完全恢复.

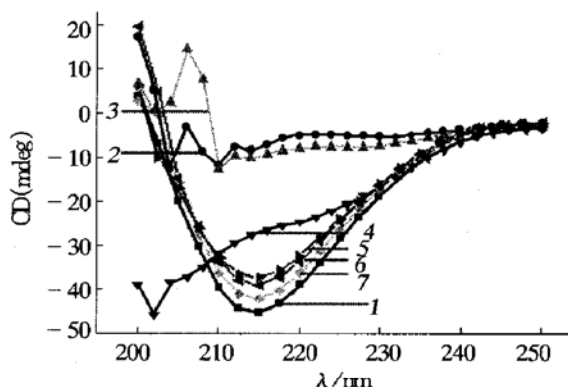


Fig. 2 Far-UV CD spectra of Hsp16.3 proteins

1: native Hsp16.3; 2, 3: denatured Hsp16.3 proteins by 12 mol/L urea or 8 mol/L guanidine chloride; 4: denatured Hsp16.3 protein by heat (at 70℃); 5~7: renatured Hsp16.3 proteins from denaturation by urea, guanidine and heat (at 100℃), respectively.

2.3 复性后 Hsp16.3 三级结构的恢复

我们进一步利用近紫外 CD 光谱来比较 Hsp16.3 在变性-复性前后三级结构的差异. 结果如图 3 所示. 与未处理的 Hsp16.3 的近紫外 CD 光

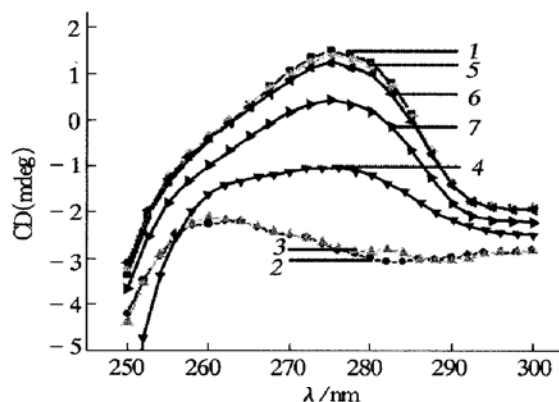


Fig. 3 Near-UV CD spectra of Hsp16.3 proteins

1: native Hsp16.3; 2, 3: denatured Hsp16.3 proteins by 12 mol/L urea or 8 mol/L guanidine chloride; 4: denatured Hsp16.3 protein by heat (at 70℃); 5~7: renatured Hsp16.3 proteins from denaturation by urea, guanidine and heat (at 100℃), respectively.

谱的比较结果表明, 在各种变性条件下 (包括脲变性, 盐酸胍变性或热变性), Hsp16.3 的三级结构

发生了很大变化. 经过脲或盐酸胍变性并透析复性的 Hsp16.3 的近紫外光谱与天然蛋白质的几乎重叠, 说明变性的 Hsp16.3 蛋白在复性后三级结构可以恢复. 但是, 在热处理后 Hsp16.3 的 CD 光谱与它们有微小的但仍是显著的差异. 这说明高达 100 °C 的加热处理使得 Hsp16.3 的三级结构发生了不可逆的变化.

3 讨 论

生物体内的许多蛋白质在以寡聚体的形式存在时才具有生物活性. 了解寡聚体蛋白的组装机制是蛋白质研究中的重要组成部分. 尽管蛋白质折叠和组装所需要的信息贮存在一级氨基酸序列中, 但是多结构域的大蛋白质分子和多亚基的寡聚蛋白常常不能自发折叠成有天然活性的构象状态. 它们的折叠和组装需要分子伴侣蛋白的帮助, 但是具体机制还不清楚. 在本研究中, 我们以九聚体形式存在的结核杆菌小分子热休克蛋白为模型, 研究了分子伴侣蛋白本身的寡聚体组装.

高温加热以及高浓度脲或盐酸胍处理是最常用的蛋白质强变性方法. 在分别经过三种不同途径的变性和复性后, 在没有其他辅助蛋白的参与下, 结核杆菌小分子热休克蛋白 Hsp16.3 都能够自发地再折叠和再组装成近乎天然结构的构象状态. 需要指出的是, 复性后的 Hsp16.3 依然具有不低于变性前的蛋白质的分子伴侣活性^[8, 10]. 这说明结核杆菌小分子热休克蛋白 Hsp16.3 具有很强的自发再折叠和自组装能力. 作为比较, 另一种真核生物的小分子热休克蛋白—— α 晶体蛋白 (α -crystallin, 来自于牛眼) 在脲或盐酸胍变性-复性后也能够自发再折叠和再组装^[11]. 但在高温处理下 α -crystallin 的再组装会形成更大的寡聚体^[12]. 这可能是由于对蛋白质而言, 高温处理后的快速冷却复性要比脲或盐酸胍引起的变性和透析复性要激烈得多. 另一方面, 也可能是由于 α -crystallin 的亚基数目 (30~50) 较大的缘故.

大多数蛋白质在高温处理下将会变性并发生聚集, 例如柠檬酸合成酶, 肌酸激酶和过氧化氢酶等等. 因此, 这些蛋白质常被用来作为测定热休克蛋白分子伴侣活性的底物. 但是, 少数蛋白质如钙调蛋白 (calmodulin) 和核糖结合蛋白 (ribose-binding protein) 等具有极端强的抗热性. 本项研

究发现 Hsp16.3 也具有这种性质. 我们注意到两种其他小分子热休克蛋白 (α -crystallin 和 Hsp16.5) 也具有这种抗热性. 作为可能在细胞处于胁迫条件下提供保护的小分子热休克蛋白, 具备这种高效的自发折叠和自发组装特性可能是分子进化的结果. 引起蛋白质抗热性的根本原因还不清楚. 通过比较氨基酸组成我们发现这类蛋白质通常缺乏或只有很少的色氨酸和半胱氨酸 (如 CaM, Hsp16.3, Hsp16.5 和 RBP 都没有这两种氨基酸). 二者之间是否具有某种相关性尚未可知.

参 考 文 献

- 1 Lowrie D B, Tascon R E, Bonato V L D, *et al.* Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature*, 1999, **400** (6741): 269~271
- 2 Lee B Y, Hefta S A, Brennan P J. Characterization of the major membrane protein of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 1992, **60** (5): 2066~2074
- 3 Cunningham A F, Spreadbury C L. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton α -crystallin homolog. *J Bacteriol*, 1998, **180** (4): 801~808
- 4 Yuan Y, Crane D D, Simpson R M, *et al.* The 16 ku α -crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (16): 9578~9583
- 5 Verbon A, Hartskeerl R A, Schuitema A, *et al.* The 14 000-molecular-weight antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is related to the α -crystallin family of low-molecular-weight heat shock proteins. *J Bacteriol*, 1992, **174** (4): 1352~1359
- 6 Ehrnsperger M, Buchner J, Gestel M. Structure and function of small heat shock proteins. In: Fink A L, Goto Y eds. *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins: Structure, Function and Mode of Action*. New York: Marcel Dekker, Inc. 1998, 533~575
- 7 Chang Z, Primm T P, Jakana J, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* 16 kDa antigen (Hsp16.3) functions as an oligomeric structure *in vitro* to suppress thermal aggregation. *J Biol Chem*, 1996, **271** (12): 7218~7223
- 8 Yang H, Huang S, Dai H, *et al.* The *Mycobacterium tuberculosis* small heat shock protein Hsp16.3 exposes hydrophobic surfaces at mild conditions: conformational flexibility and molecular chaperone activity. *Protein Sci*, 1999, **8** (1): 174~179
- 9 Ausubel F, Brent R, Kingston R E, *et al.* *Molecular Biology*. USA: John Wiley & Sons Inc, 1997. 10.2.18~10.2.21
- 10 Mao Q, Ke D, Chang Z. Electrostatic interactions play a critical role in *Mycobacterium tuberculosis* Hsp16.3 binding of substrate proteins. *Biochemistry (Moscow)*, 2001, **66** (8): 904~908
- 11 Maiti M, Kono M, Chakrabarti B. Heat-induced changes in the conformation of α - and β -crystallins: unique thermal stability of α -crystallin. *FEBS Lett*, 1988, **236** (1): 109~114
- 12 Raman B, Ramakrishna T, Rao C M. Rapid refolding studies on the chaperone-like α -crystallin. *J Biol Chem*, 1995, **270** (34): 19888~19892

The High-efficient Spontaneous Refolding and Reassembly of *Mycobacterium tuberculosis* Small Heat Shock Protein Hsp16.3*

MAO Qi-Long, FENG Xiu-Guang, CHANG Zeng-Yi**

(The Department of Biological Science and Biotechnology, Protein Science Laboratory of the Education Ministry,
Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract The small heat shock protein Hsp16.3 of *Mycobacterium tuberculosis* was shown to be a trimer-of-trimers. Hsp16.3 proteins were denatured under three kinds of strong denaturing conditions by heat treatment (at 100 °C, 15 min) or chemical reagents (12 mol/L urea or 8 mol/L guanidine, 4 hours) and then were renatured by cooling or dialysis. The secondary, tertiary and quaternary structures of Hsp16.3 were investigated by using far- and near-UV circular dichroism as well as pore-gradient polyacrylamide gel electrophoresis, respectively. The data clearly showed that the renatured Hsp16.3 proteins almost completely regained its native conformation, thus suggesting the strong ability of Hsp16.3 to refold and reassembly to its native conformation.

Key words heat shock protein, denature, renature, refold, reassembly

* This work was supported by grants from the National Basic Research Programs of China (G1999075607) and the National Science Foundation for Outstanding Young Scientists (39725008).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62772251, E-mail: changzy@mail.tsinghua.edu.cn

Received: April 17, 2001 Accepted: June 5, 2001