

线虫中的小分子热休克蛋白 HSP12.1 具有类分子伴侣活性

秦焱¹⁾ 王慧²⁾ 昌增益^{1)*}

(¹⁾北京大学生命科学学院, 北京 100871; ²⁾南京大学生命科学学院, 南京 210093)

摘要 很多种类的小分子热休克蛋白 (small heat shock protein, sHSP) 都能在胁迫条件下抑制蛋白质的聚集, 显示出了类分子伴侣活性, 这种活性是 ATP 非依赖型的. 从已经进行的实验发现, 线虫 *C.elegans* 中最小的小分子热休克蛋白家族成员 HSP12.1 具有类分子伴侣活性, 以胰岛素、乙醇脱氢酶和溶菌酶做底物发现 HSP12.1 能够一定程度地抑制底物的热聚集, 虽然这种活性较一些经典的分子伴侣蛋白(线虫中的 HSP16.1)要低. 与此不同, 另外 3 种和其分子质量相近的 sHSP12s (HSP12.2、HSP12.3 和 HSP12.6)却没有检测出这样的类分子伴侣活性, 虽然它们在一级结构上有很高的相似性. 另外, 在大肠杆菌中表达 HSP12.1 蛋白能够提高细菌在高温环境下的生存率, 45°C 处理后的生存率比未表达 HSP12.1 的菌高 4 倍左右, 不过在线虫中是否发挥同样的功能还不是很清楚. 从研究结果来看, C 端“尾巴”结构域对 sHSP 发挥类分子伴侣活性不是必要的, 在 HSP12.1 中没有 C 端“尾巴”结构域也有类分子伴侣活性就证明了这一点. N 端结构域可能在发挥类分子伴侣活性中发挥比较重要的作用, 当然 α -crystallin 结构域也可能参与到发挥这样的功能当中.

关键词 线虫, 小分子热休克蛋白(sHSP), 类分子伴侣活性
学科分类号 Q5

在线虫中, 现在已经发现了 14 种小分子热休克蛋白 (small heat shock protein, sHSP), 根据分子质量的不同可以分成 6 组: sHSP12s (包括 HSP12.1、HSP12.2、HSP12.3 和 HSP12.6)、sHSP16s (HSP16.1、HSP16.2、HSP16.41、HSP16.48 以及新发现的 F08H9.3、F08H9.4^[1])、HSP25、HSP43、HSP17.5 和胁迫诱导蛋白 -1 (stress-induced protein-1, SIP-1). 不同的 sHSP 都具有相似的一级结构, 都包含有一个保守的 α -crystallin 结构域、N 端和 C 端尾巴, 只是在 N 端及 C 端尾巴的长度及氨基酸组成上有比较明显的不同. 二级结构上, 则主要以 β 折叠为主. sHSP12s 是动物细胞小分子热休克蛋白中最小的一类, 有着最短的 N 端和 C 端, 最早由 Caspers 等^[2]发现, 后来又通过序列检索发现了 3 种同类的 sHSP12s. 这 4 种 sHSP12s 在结构上十分相似, 大约有 42%~67% 的氨基酸完全相同. HSP12.6 和 HSP12.3 基因位于第 IV 染色体上, HSP12.1 基因位于第 I 染色体上, HSP12.2 基因则位于第 III 染色体上. sHSP12s 在线虫中呈现组成型

表达, 在多种胁迫条件作用下并不会出现明显的诱导表达. sHSP12s 在线虫发育的早期 L1 (larval stage 1) 呈现出最高的表达量, 而且在全身均有表达分布. 在发育的 L4 期和成虫期, sHSP12s 的表达量大大下降, 但是在受精囊和一些产卵器细胞中仍有丰富的表达, 实验指出, sHSP12s 可能表达位于精母细胞或精子细胞的胞浆中, 在两性体线虫体内, 还能在排卵器肌肉细胞中检测到 sHSP12s^[3]. 与其他小分子热休克蛋白不同, sHSP12s 并不形成很大的寡聚复合物, 一般是以单体或四聚体的形式存在, 体外实验分析没有发现 HSP12.2、HSP12.3^[4] 和 HSP12.6^[5] 具有类分子伴侣活性. 不过通过我们对 sHSP12s 中最小的一个成员 HSP12.1 的研究发现, 这种小分子热休克蛋白具有类分子伴侣活性, 这在以前的文献中是没有报道的.

* 通讯联系人. Tel: 010-62758058, E-mail: changzy@pku.edu.cn

收稿日期: 2006-12-11, 接受日期: 2007-01-08

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 线虫. N2 线虫 (北京大学樊启昶教授惠赠).

1.1.2 菌种与质粒. *E.coli* DH5 α , *E.coli* BL21 (DE3), pET21a 质粒均由本实验室保存.

1.1.3 主要试剂. TRIzol 总 RNA 提取试剂盒为北京 TIANGEN 公司产品; 逆转录试剂盒和各种内切酶、修饰酶为大连 TAKARA 公司产品; 质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒、核酸 Marker 和蛋白质 Marker 为北京 TRANSGEN 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 线虫 HSP12.1 的基因克隆、表达和纯化. 采用 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒提取 N2 线虫的总 RNA. 以线虫总 RNA 为模板, 利用逆转录试剂盒, 以 ATACATATGCACACAATTCCAATTACAACCTG 作为 5' 引物, 以 ATACTCGAGAAGTTTATTGGCAGTGATTG 作为 3' 引物得到 HSP12.1 的 cDNA. 利用 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点, 将 HSP12.1 基因插入到 pET21a 表达载体上, 测序正确后转入 *E.coli* BL21(DE3) 菌中进行诱导表达. 表达的蛋白质利用 His-Tag 亲和色谱柱纯化, SDS-PAGE 鉴定纯化蛋白质的纯度.

1.2.2 戊二醛交联实验鉴定 HSP12.1 的寡聚状态. 100 μ l 体系加入 5% 的戊二醛 10 μ l, 蛋白质终浓度为 0.5 g/L, 室温下交联 10 min, 然后进行 SDS-PAGE 鉴定.

1.2.3 凝胶排阻色谱鉴定 HSP12.1 的寡聚状态. 参考文献[6]利用 FPLC superdex 75 10/300 GL 凝胶排阻色谱柱分析 HSP12.1 的寡聚状态. HSP12.1 蛋白上样量为 0.5 ml, 蛋白质浓度为 1 g/L. 洗脱缓冲液采用 20 mmol/L pH 7.5 PBS + 0.15 mol/L NaCl, 洗脱流速控制在 0.3 ml/min.

1.2.4 类分子伴侣活性测定. 参考经常采用的测定分子伴侣活性的方法^[7], 分别以胰岛素、乙醇脱氢酶和溶菌酶作为底物 (蛋白质浓度为 0.5 g/L) 测定 HSP12.1 的类分子伴侣活性.

1.2.5 对 *E.coli* 的热保护作用实验. 参考 Takeuchi 等^[8]采用的方法, 分析过表达 HSP12.1 对 *E.coli* 的热保护作用. 分别将转化有 HSP12.1-pET21a 的质粒和 pET21a 质粒的 *E.coli* BL21(DE3) 在 37 $^{\circ}$ C 进行培养. 当菌生长到 A_{600} 达到 0.6 左右时, 加入 0.5 mmol/L IPTG 诱导蛋白质表达 2 h. 然后将每种菌分成 2 份, 一份转入到 45 $^{\circ}$ C 条件下热处理 1 h; 另

一份继续在 37 $^{\circ}$ C 培养 1 h. 用 0.9% NaCl 将菌稀释, 涂布氨苄青霉素抗性的 LB 平板, 在 37 $^{\circ}$ C 培养过夜. 将菌落计数, 以 37 $^{\circ}$ C 条件下生长的菌落数目为 100%, 计算 45 $^{\circ}$ C 处理后的菌落百分数作为生存率.

2 结果

2.1 利用 His-Tag 亲和纯化可以得到纯度很高的 HSP12.1 蛋白

重组表达的 HSP12.1 蛋白大部分以可溶性形式存在, 而且表达量很大; 利用 His-Tag 亲和纯化一步就可以得到纯度很高的蛋白质 (图 1); 透析后, 将纯化的蛋白质冻干保存.

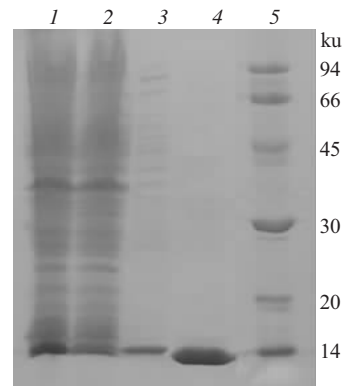


Fig. 1 Overexpression in *E.coli* BL21 (DE3) and purification of Hsp12.1

Electrophoresis of various protein samples on a 12% SDS-PAGE. 1: Soluble fraction of BL21 (DE3) expressing recombinant protein; 2: Fraction not absorbed on the his-tag affinity column; 3: Washing fraction with 10 mmol/L imidazole; 4: Eluting fraction with 250 mmol/L imidazole.

2.2 HSP12.1 以四聚体的寡聚形式存在

通过戊二醛交联实验和 FPLC 凝胶排阻色谱发现, HSP12.1 是以四聚体的寡聚形式存在 (图 2a, 2b). 从凝胶排阻色谱结果来看, HSP12.1 呈现一个单一的吸收峰, 位置在 44 ku 左右, 这和理论计算的 HSP12.1 的四聚体分子质量十分接近. 化学交联的电泳结果可以看出有 4 条明显的蛋白质带, 分别对应着 HSP12.1 的单体到四聚体. 结合 2 个实验的结果, 我们认为 HSP12.1 应该是以四聚体的寡聚形式存在.

2.3 HSP12.1 具有类分子伴侣活性

分别以胰岛素、乙醇脱氢酶和溶菌酶作为底物测定 HSP12.1 的类分子伴侣活性. 结果发现, 以 3 种底物都可以测定出 HSP12.1 具有类分子伴侣活性. 但对 insulin 的抗聚集作用要弱于其他 2 种蛋白质 (图 3a, 3b, 3c).

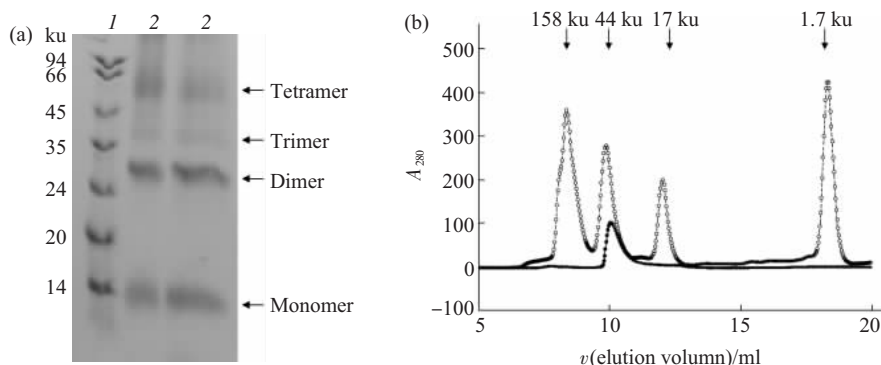


Fig. 2 Analysis of HSP12.1 structure by gel filtration and chemical cross-linking

(a) HSP12.1 was incubated with 5% glutaraldehyde for 10 min. (b) The native size of HSP12.1 was estimated by gel filtration on a superdex75 10/300 GL column. ● —● : HSP12.1; ○ ---○ : Protein standard.

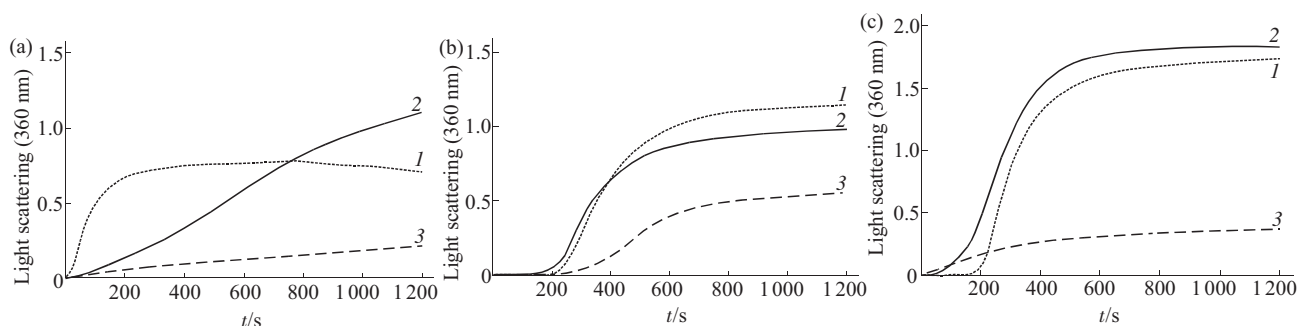


Fig. 3 Prevention of thermal aggregation of proteins by HSP12.1

(a) Aggregation of ADH in the presence of HSP12.1 at the indicated concentration. 1: ADH alone; 2: +0.5 g/L HSP12.1; 3: +2.5 g/L HSP12.1. (b) Aggregation of insulin in the presence of HSP12.1 at the indicated concentration. 1: Insulin alone; 2: +0.5 g/L HSP12.1; 3: +2.5 g/L HSP12.1. (c) Aggregation of lysozyme in the presence of HSP12.1 at the indicated concentration. 1: Lysozyme alone; 2: +0.5 g/L HSP12.1; 3: +2.5 g/L HSP12.1.

2.4 过量表达 HSP12.1 能够提高 *E.coli* 的抗热性

将 HSP12.1-pET21a 质粒转入到 *E.coli* BL21 (DE3)菌中, 用 IPTG 诱导目的蛋白表达, 结果发现, 表达 HSP12.1 蛋白的菌在 45°C 条件下其生存率要大于没有表达 HSP12.1 的菌(图 4). 可见表达 HSP12.1 对于增强细菌的抗热能力、提高在高温条件下的生存率是有利的.

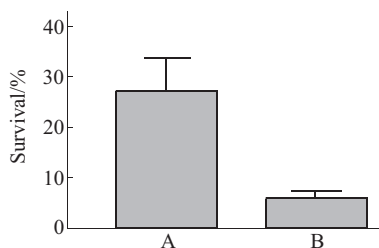


Fig. 4 Thermotolerance of *E.coli* cells overexpression HSP12.1

Thermotolerance assays were performed at 45°C. The survival of *E.coli* with HSP12.1 induction was significantly increased (A) compared with that without HSP12.1 induction (B).

3 讨 论

小分子热休克蛋白在结构上通常可以分为 3 个结构域: N 端结构域, C 端结构域(即 α -crystallin 结构域)和 C 端“尾巴”结构域. 所有的小分子热休克蛋白的 α -crystallin 结构域具有很高的同源性, 而 N 端结构域和 C 端“尾巴”结构域则差异很大, 造成了它们在分子质量大小和生物学性质上的差异. 所有的小分子热休克蛋白都是以寡聚体的形式存在的, 但不同小分子热休克蛋白形成的寡聚体大小也不尽相同^[9]. 很多小分子热休克蛋白都能在胁迫条件下抑制蛋白质的聚集, 显示出类分子伴侣活性(chaperone-like activity). 小分子热休克蛋白对变性蛋白质底物的结合是广泛的、非特异性的, 也是 ATP 非依赖型的^[9]. 对于小分子热休克蛋白发挥类分子伴侣作用的基本机制, 现在普遍的观点是在保护蛋白质聚集的过程中解离成小的亚基^[10], 通过亚基识别并结合去折叠蛋白的疏水表面, 通过抑制变

性蛋白自身的疏水面暴露而引起的聚集, 来达到抑制底物蛋白聚集的效果. 在线虫中发现了 4 种分子质量在 12 ku 左右的小分子热休克蛋白, 这是除了 QsHSP14.1-CI 以外最小的一类小分子热休克蛋白^[1]. 虽然 HSP12s 之间在 α -crystallin 结构上存在比较高的同源性, 但他们在类分子伴侣活性上的差异还是比较明显的, 除了 HSP12.1, 另外 3 种蛋白质都没有检测出类分子伴侣活性. 分析 HSP12.1 的氨基酸组成, 它是 4 种 HSP12s 中唯一不含有半胱氨酸的蛋白质, 有趣的是很多具有分子伴侣活性的蛋白质都不含半胱氨酸, 这也可能是 HSP12.1 具有分子伴侣活性的一个原因^[7]. 另一方面, 是否具有分子伴侣活性是蛋白质本身所具有的特征, 一些很小的变化可能就会导致这种能力的丧失, 正如 HSP12.2 和 HSP12.3, 即使将 α -crystallin 的 N 端序列和 C 端序列拼接到这 2 种蛋白质上, 也能够形成大的寡聚体, 但却没有类分子伴侣活性^[2]. 2 种均具有类分子伴侣活性的 α A-crystallin 和 α B-crystallin 在交换了 N 端序列后, 类分子伴侣活性出现了明显变化, 一个升高, 一个完全没有, 这说明蛋白质的分子伴侣活性与蛋白质的整体结构是密切相关的^[13]. 另外利用经典的分子伴侣活性测定实验, 我们发现, HSP12.1 对不同底物的保护作用有所不同, 对 insulin 的保护能力较差, 而对溶菌酶、乙醇脱氢酶的效果比较好, 这有可能是因为其缺少 C 端“尾巴”造成的, 这段序列的亲水特征往往会提高复合物的可溶性^[14]. HSP12.1 在体内发挥什么样的作用现在还不清楚, 但似乎和胁迫保护无关, 在胁迫条件下并没有发现其表达有明显的变化. 在 *E.coli* 中表达 HSP12.1 可以提高其在较高温度下的存活率, 这可能是由于 HSP12.1 能够保护蛋白质, 防止出现热聚集. 有很多文献都报道在细菌中表达具有 Chaperone-like activity 的蛋白质能够提高细菌胁迫条件下的生存率^[15-18]. 但是, HSP12.1 在线虫体内是否发挥同样的作用还需要实验进一步的验证.

参 考 文 献

- Shim J, Im S H, Lee J. Tissue-specific expression, heat inducibility, and biological roles of two hsp16 genes in *Caenorhabditis elegans*. FEBS Lett, 2003, **537** (1~3): 139~145
- Caspers G J, Leunissen J A, de Jong W W. The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved "alpha-crystallin domain". J Mol Evol, 1995, **40** (3): 238~248
- Ding L, Candido E P. Association of several small heat-shock proteins with reproductive tissues in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Biochem J, 2000, **351** (Pt 1): 13~17
- Kokke B P, Leroux M R, Candido E P, et al. *Caenorhabditis elegans* small heat-shock proteins Hsp12.2 and Hsp12.3 form tetramers and have no chaperone-like activity. FEBS Lett, 1998, **433** (3): 228~232
- Leroux M R, Ma B J, Batelier G, et al. Unique structural features of a novel class of small heat shock proteins. J Biol Chem, 1997, **272** (19): 12847~12853
- Ding L, Candido E P. HSP25, a small heat shock protein associated with dense bodies and M-lines of body wall muscle in *Caenorhabditis elegans*. J Biol Chem, 2000, **275** (13): 9510~9517
- Zhang X, Fu X, Zhang H, et al. Chaperone-like activity of beta-casein. Int J Biochem Cell Biol, 2005, **37** (6): 1232~1240
- Takeuchi S. Analytical assays of human HSP27 and thermal-stress survival of *Escherichia coli* cells that overexpress it. Biochem Biophys Res Commun, 2006, **341** (4): 1252~1256
- de Jong W W, Caspers G J, Leunissen J A. Genealogy of the alpha-crystallin-small heat-shock protein superfamily. Int J Biol Macromol, 1998, **22** (3~4): 151~162
- Gu L, Abulimiti A, Li W, et al. Monodisperse Hsp16.3 nonamer exhibits dynamic dissociation and reassociation, with the nonamer dissociation prerequisite for chaperone-like activity. J Mol Biol, 2002, **319** (2): 517~526
- Jofre A, Molinas M, Pla M A. 10-kDa class-CI sHsp protects *E. coli* from oxidative and high-temperature stress. Planta, 2003, **217** (5): 813~819
- Kokke B P, Boelens W C, de Jong W W. The lack of chaperone-like activity of *Caenorhabditis elegans* Hsp12.2 cannot be restored by domain swapping with human alphaB-crystallin. Cell Stress Chaperones, 2001, **6** (4): 360~367
- Kumar L V, Rao C M. Domain swapping in human alpha A and alpha B crystallins affects oligomerization and enhances chaperone-like activity. J Biol Chem, 2000, **275** (29): 22009~22013
- Lindner R A, Carver J A, Ehrmsperger M, et al. Mouse Hsp25, a small shock protein. The role of its C-terminal extension in oligomerization and chaperone action. Eur J Biochem, 2000, **267**(7): 1923~1932
- Takeuchi S, Mandai Y, Otsu A, et al. Differences in properties between human alphaA- and alphaB-crystallin proteins expressed in *Escherichia coli* cells in response to cold and extreme pH. Biochem J, 2003, **375** (Pt 2): 471~475
- Crack J A, Mansour M, Sun Y, et al. Functional analysis of a small heat shock/alpha-crystallin protein from *Artemia franciscana*. Oligomerization and thermotolerance. Eur J Biochem, 2002, **269** (3): 933~942
- Fortin A, Raybaud-Diogene H, Tetu B, et al. Overexpression of the 27 kDa heat shock protein is associated with thermoresistance and chemoresistance but not with radioresistance. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2000, **46** (5): 1259~1266
- Horvath I, Glatz A, Varvasovszki V, et al. Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of hsp17 as a "fluidity gene". Proc Natl Acad Sci USA, 1998, **95** (7): 3513~3518

HSP12.1, A Small Heat Shock Protein in *C.elegans*, Has Chaperone-like Activity

QIN Yan¹⁾, WANG Hui²⁾, CHANG Zeng-Yi^{1)*}

¹⁾College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China;

²⁾College of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract Many kinds of small heat shock proteins (sHSPs) are able to prevent protein aggregation in stress, which show the ATP independent chaperone-like activity. The smallest protein HSP12.1 in sHSP family of the nematode *Caenorhabditis elegans* exhibits chaperone-like activities *in vitro*. It prevents protein aggregation in a certain extent when use insulin, ADH and lysozyme as the substrates, though it is not as efficient as the typical chaperones (such as HSP16.1 in *C. elegans*). By contrast, the other three sHSP12s (HSP12.2, HSP12.3 and HSP12.6), which have similar molecular masses and primary structure, appear devoid of *in vitro* chaperone-like activities. In addition, overexpressing HSP12.1 enhances cell thermotolerance of *Escherichia coli*. The survival rate of the HSP12.1 overexpressed cells is 4-fold higher than the control, yet whether it does the same function in *C. elegans* is still unknown. Results indicate that C-terminal region is not necessary for the chaperone-like activity of sHSPs, for HSP12.1 terminates a short C-terminal tail. N-terminal domain may play a relatively important role in the exhibition of chaperone-like activities, while α -crystalline domain may also involve in this function.

Key words *C.elegans*, small heat shock proteins sHSP, chaperone-like activity

*Corresponding author . Tel: 86-10-62758058, E-mail: changzy@pku.edu.cn

Received: December 11, 2006 Accepted: January 8, 2007