

分子内分子伴侣机制的研究进展*

贾焱^{1)**} 孙英杰¹⁾ 何聪芬¹⁾ 唐双焱²⁾ 朱恩光¹⁾

¹⁾ 北京工商大学理学院, 北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京 100048;

²⁾ 中国科学院微生物研究所, 微生物生理与代谢工程重点实验室, 北京 100101)

摘要 在原核生物、真核生物及病毒中, 一些蛋白质的折叠不符合 Anfinsen 原则, 即依靠自身的氨基酸序列是不够的, 还需一段被称为分子内分子伴侣(IMC)的肽段来协助折叠。根据机制不同, IMC 可分为两类: 第一类 IMC 引导成熟肽折叠为具有空间结构的蛋白质; 第二类 IMC 协助成熟肽的多聚化而使其获得生物学功能。IMC 能提供比分子伴侣更契合的结构, 更有效地引导成熟肽折叠, 是一种更优的折叠策略。研究 IMC 分子机制, 不仅能够确定 IMC 上哪些残基的协同作用引导成熟肽折叠, 而且可通过改变或修饰其侧链来改造成熟肽, 拓展传统的蛋白质工程。

关键词 分子内分子伴侣, 成熟肽, 蛋白质折叠, 空间结构, 分子机制

学科分类号 Q71

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0387

1958 年, Crick^[1]提出中心法则, 并预测蛋白质的氨基酸序列包含了其结构和功能的全部信息。1973 年, Anfinsen^[2]的研究结果证实了 Crick 的推测。但随后的研究发现, 很多蛋白质的正确折叠仅仅依靠自身的氨基酸序列是不够的: 一些蛋白质的折叠需要分子伴侣(molecular chaperone)的参与^[3]; 还有一些蛋白质的折叠需要自身一段特殊肽段的协助^[4]。此肽段与蛋白质共同表达, 以肽键相连, 具有与分子伴侣类似的功能, 并在蛋白质折叠完成后被降解。因此将其称为分子内分子伴侣(intramolecular chaperone, IMC)。由 IMC 协助的蛋白质折叠并不完全符合蛋白质折叠的热力学假说, 它们的天然构象不是处于热力学最稳定的构象, 而是处于一种受动力学控制的亚稳态。

此类蛋白质的多肽链一般可分为两段^[4]: 一段是 IMC, 位于多肽链的 N 端或 C 端; 另一段是成熟肽, 执行蛋白质的生物学功能。IMC 引导成熟肽折叠, 使其具有完整的生物活性后, 自身则被降解。虽然 IMC 在成熟的蛋白质中并不存在, 同样也不参与其生物学功能的执行, 但它们在成熟肽的折叠过程中起到很重要的作用, 一级结构和高级结构的改变可影响成熟肽的折叠、结构及功能, 甚至

完全阻止成熟肽的折叠^[5-6]。这种作用一般通过氢键来执行, 使成熟肽的折叠常数发生改变, 并且在成熟肽折叠完成之后留下“印迹”, 即改变成熟肽的高级结构, 并进一步影响其功能, 如蛋白质的生物活性、酶的动力学参数等。由于折叠时期 IMC 对成熟肽结构和功能的影响被称为蛋白质记忆(protein memory)^[7]。发生变化的 IMC 可以改变成熟肽的高级结构和生物学功能, 进而导致疾病的发生, 此类疾病被统称为蛋白质记忆疾病。由于成熟肽的氨基酸序列并无变化, 而 IMC 在完成其功能之后就被降解, 因此这些疾病的发病原因很难找到。如人脑源性神经营养因子(BDNF)的 IMC 上一个单点突变(Val66Met)即可导致人失忆。病变 BDNF 和正常 BDNF 的一级结构相同, 但 IMC 的单点突变引起了 BDNF 高级结构和功能的变化, 从而导致疾病发生^[8]。

* 国家自然科学基金资助项目(31501415)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-68984937, E-mail: jiayan@btbu.edu.cn

收稿日期: 2016-01-04, 接受日期: 2016-03-15

1 IMC 的分类及机制

根据 IMC 在多肽链中的位置及分子机制, 可将 IMC 分为两类: 第一类 IMC 一般位于蛋白质的 N 端, 作用是帮助成熟肽由一条无结构的多肽链折叠为有空间结构的蛋白质, 并获得生物学功能; 第二类 IMC 一般位于蛋白质 C 端, 作用是帮助成熟肽由无功能的单体形成有功能的多聚体. 此类 IMC 所协助的成熟肽, 虽然单体具有空间结构, 但是并没有生物学功能, 其功能的获得是随着多聚体的形成而拥有的. 分子机制如图 1 所示.

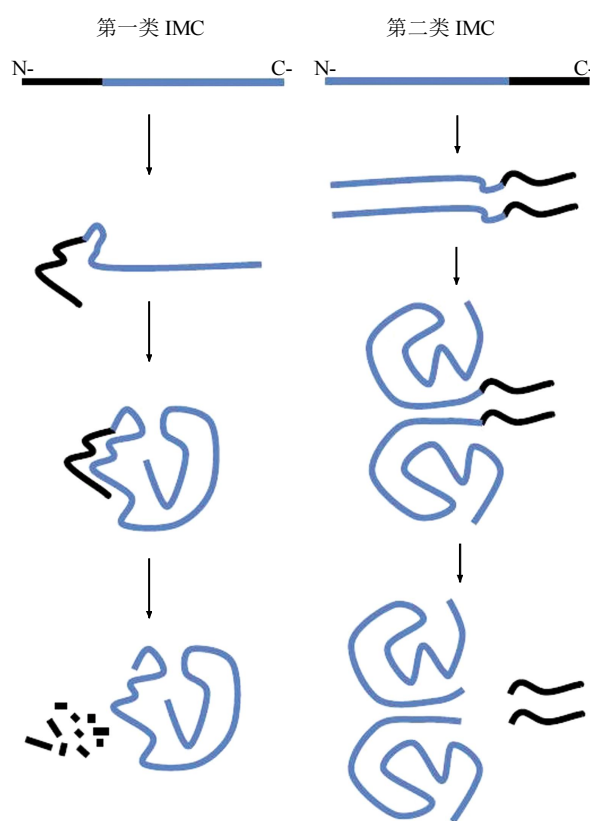


Fig. 1 Schematic models for the functions of two intramolecular chaperones

图 1 两类 IMC 分子机理示意图
蓝色肽段为成熟肽, 黑色肽段为 IMC.

1.1 第一类 IMC

此类 IMC 广泛存在于原核生物、真核生物及病毒的蛋白酶内, 最初是在研究一种分泌型蛋白酶——枯草杆菌蛋白酶(subtilisin E)的体外复性过程中被发现并研究的^[9], 其 IMC 位于多肽链的 N 端, 在 subtilisin E 的折叠过程中必不可少.

Inouye 等^[9]在 subtilisin E 的体外复性实验中发现, subtilisin E 在经过变性剂处理之后变为一条无结构的多肽链, 当变性剂缓慢去除, 成熟肽却不能正确折叠, 仍不具有高级结构, 说明 subtilisin E 的成熟肽并不具备自身折叠所需的所有信息. 但是当 subtilisin E 的成熟肽与 N 端的一肽段共同表达时, 成熟肽就能够通过复性, 折叠为具有空间结构的蛋白质, 故将此 N 端的肽段命名为 IMC. 贾焱等^[10]在研究纳豆激酶(nattokinase, NK)体内折叠时发现, 与 IMC 共表达的成熟肽可以正确折叠, 而无 IMC 时, 成熟肽则成为包涵体, 即使进行体外复性也不能成功, 说明成熟肽在体内折叠时, IMC 也是必不可少的. 进一步的研究显示^[11], IMC 上的单点突变 (Tyr10Ala、Gly13Ala、Gly34Ala 和 Gly35Ala) 可以改变 NK 的结构和酶动力学参数.

在第一类 IMC 协助成熟肽折叠的分子机制方面, Inouye 等^[12]的贡献很大. 他们通过 subtilisin E 的一系列体外复性实验, 模拟 subtilisin E 的折叠过程, 并获得了一些关键信息和动力学参数, 提出了 IMC 协助 subtilisin E 折叠的分子机理: a. IMC 自身包含其高级结构的全部信息, 被翻译之后, 可自发折叠具有空间结构; b. IMC 与成熟肽形成相互作用, 通过此作用引导成熟肽折叠; c. 成熟肽折叠完成, 获得蛋白酶活性, 水解 IMC 和成熟肽之间的肽键并降解 IMC, 成熟肽释放. 在这个复杂的折叠过程中, IMC 不仅帮助成熟肽折叠, 而且在其折叠完成之前可作为抑制剂结合在活性中心, 直至成熟肽具有生物活性后, IMC 与成熟肽之间的肽键才被水解, 随后 IMC 被降解. 此步骤是成熟肽折叠过程中的限速步骤, 且是自发过程, 折叠好的成熟肽会自发降解 IMC. 此步骤后, 成熟肽加速完成折叠, 成为一个具有高级结构和生物活性的成熟蛋白质.

有一些酶活性中心的构象比较特殊, 由类似“盖子”的结构组成, 此结构的形成必需 IMC 的协助. 假单胞菌 Pf-5 (*Pseudomonas protegens* Pf-5) 中脂肪酶 A 的 N 端肽段是一跨膜结构域, 此肽段并不参与脂肪酶 A 的催化作用, 但它缺失后, 脂肪酶 A 不能在细胞内定位且酶活大幅下降. Yan 等^[13]的研究发现, 此 N 端肽段为一 IMC, 位于脂肪酶 A 的结构内部, 协助活性中心的“盖子”(由 α 螺旋构成)由“关闭状态”转变为“打开状态”, 这是第一个在脂肪酶亚家族 I.1 中发现的由 IMC 协助折叠的实例. Zhang 等^[14]对 aly-SJ02 的研究发现,

这是一种细菌海藻酸裂解酶, 属于多糖裂解酶家族, 其活性中心处的一个环状盖子结构构成了底物进入活性中心的大门, 其中 Tyr353 是最重要的一个氨基酸残基. aly-SJ02 的 N 端肽段可作为 IMC 协助活性中心的折叠, 包括环状盖子正确构象的形成.

大多数枯草杆菌蛋白酶的 N 端肽段都是 IMC, 但温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*, ASP)的枯草杆菌蛋白酶是一个例外, Tsuge 等^[15]的研究发现, 此酶没有 IMC, 但是有一个分子外分子伴侣, 在此酶的下流表达, 对其折叠十分重要, 被称为 ORF2. 它有 3 个肽段: N 端肽段、中间肽段和 C 端肽段. N 端肽段和 C 端肽段的片段缺失(Δ N43、 Δ N64 及 Δ C1、 Δ C5)都会导致酶的折叠失败, 这是在枯草杆菌蛋白酶中首次发现的特殊实例.

利用 IMC 的分子机制还可改造蛋白质, Ueda 等^[16]确定了羧肽酶(carboxypeptidase Y, CPY)的 IMC 与成熟肽的相互作用位点, 发现在成熟肽折叠时, IMC 不仅可协助其折叠, C 端的 9 个氨基酸残基还结合在成熟肽活性中心的底物结合位点来抑制酶活, 这与 subtilisin E 的 IMC 抑制酶活的分子机制相似. 通过突变 CPY 的 IMC^[17], 得到了一系列一级结构不变、而高级结构和酶活性改变的 CPY 突变体; 同时发现, 米根霉菌脂肪酶(rhizopus oryzae lipase, ROL)的 N 端肽段也可作为 IMC 协助成熟肽(mature ROL, mROL)的折叠, Ueda 等^[18]构建 IMC 突变体, 获得了一个对中等长度脂肪酸链有更高亲和力且更加稳定的酶(mROLLimp), 它与野生型的 mROL 有相同的氨基酸序列, 却具有不同的高级结构、酶活和稳定性, 进一步证明了 IMC 的功能, 又得到了改造的蛋白质.

IMC 协助成熟肽折叠是一种广泛存在的蛋白质折叠策略, 它不仅是原核生物一些酶的折叠机制, 在真核生物中, 一些蛋白质获得空间结构也需要 IMC 的协助. Kliemannel 等^[19]对神经生长因子(nerve growth factor, NGF)的研究表明, 在其被表达之后, 其 N 端的 IMC 可以协助成熟肽起始折叠并稳定在一个过渡态, 此时, 成熟肽上 3 个特定的二硫键很容易形成, 随后凭借这些二硫键的作用形成一个半胱氨酸结, 并完成最终的折叠. 与 subtilisin E 和 NK 不同^[20], IMC 必须与成熟肽以肽键相连, 才能发挥作用, 且 IMC 完成协助作用后, 此肽键不被成熟肽降解, 而是被激素原转化酶

降解.

胰岛素的折叠也需要 IMC, 有活性的胰岛素由 A 肽链和 B 肽链组成^[21], 以链间二硫键连接. 在胰岛素的一级结构上, 有执行 IMC 功能的 C 肽链, 位于 A、B 肽链(分别是 N 端、C 端肽段)之间. Feng 等^[21]的实验表明, C 肽链可独立折叠, 然后以类似脚手架的功能稳定 A 肽链的 N 端和 B 肽链的 C 端, 增加其稳定性并促使链间二硫键的形成, 之后被切除. 与其他 IMC 的不同之处在于, Munte 等^[22]发现 C 肽链还具有其他的生理学功能, 如激活 Na^+/K^+ -ATPase 的活性等. 但 C 肽链最主要的功能是作为 IMC 来协助胰岛素折叠为活性形式.

兔肌肌酸激酶(rabbit muscle creatine kinase, RMCK)是一个需要 IMC 协助折叠又比较特殊的例子, 其 IMC 并不是由 N 端或 C 端的肽段来充当. Yan 等^[23]对其研究发现, RMCK 具有 N 端和 C 端两个结构域, 它们之间的肽段被称为 linker, 实验结果显示, linker 具有 IMC 功能, 可帮助 RMCK 折叠, 并能抑制 N 端与 C 端结构域的聚集和沉淀, 进一步分子动力学模拟的研究确定了 linker 上 Phe-250、Val-255 和 Val-347 为 3 个重要的氨基酸残基^[24], 它们的突变可导致 C 端结构域的聚集而阻碍折叠.

IMC 协助蛋白质折叠的机制也存在于病毒内, 且对病毒蛋白的特殊结构及侵染功能具有重要意义. Teschke 等^[25]对噬菌体 P22 的研究发现, 其衣壳蛋白中的 I 结构域(I-domain)位于蛋白质高级结构的最外层, 单独表达后可自发折叠, 具有很强的热稳定性, 而衣壳蛋白的核心结构域(core coat protein)单独表达时则发生折叠障碍. 若两者共同表达, I 结构域可维持整个衣壳蛋白的热稳定性, 并协助其有效折叠, 更为重要的是, 它可以帮助衣壳蛋白中 HK97-like core 通过正确折叠以获得柔性, 可保证衣壳蛋白在噬菌体组装和成熟时必需的柔变能力.

1.2 第二类 IMC

第二类 IMC 可帮助成熟肽由无功能的单体形成有功能的多聚体, 目前发现的此类 IMC 没有第一类 IMC 的数量多, 但作用也一样无可替代. 它主要存在于真核生物和病毒中.

真核生物中需要 IMC 的一个典型蛋白是血管性血友病因子(von willebrand factor, VWF). 当血管破裂时, VWF 可与胶原纤维和血小板结合形成

血栓, 防止大量失血. Rosenberg 等^[26]的研究发现, 有功能的 VWF 是一个多聚体, 其 N 端肽段是 IMC, 它有 2 个同源的 D 结构域, 可以先协助 VWF 的 C 端形成分子间二硫键而形成二聚体, 再逐步多聚化, 完成多聚化的 VWF 具有了生物学功能, 之后 IMC 被降解. 实验结果显示, N 端肽段的单点突变(Tyr87Ser)会使 VWF 的二聚化受到阻碍而损失功能, 进一步证明了其 IMC 作用.

病毒中也有一些蛋白质的成熟需要此类 IMC 的协助. 在研究一种可侵染 *E. coli* 的噬菌体时^[27], Stummeyer 等^[27]发现此噬菌体尾刺中有一种内皮唾液酸蛋白酶, 其活性形式是一个同型三聚体. 单体的 C 端肽段对于此酶的生物学功能没有贡献, 但当其缺失时, 此酶就变为无活性的包涵体. 同时, Schahn 等^[28-29]的研究指出, 其 C 端肽段可独立于酶结构域折叠, 并进一步聚合为同型六聚体, 表明 C 端肽段作为 IMC 发挥作用, 可协助其单体聚合为有活性的多聚体.

2 IMC 研究的意义

2.1 理论意义

目前的实验结果表明, 同一类别、甚至相同家族的 IMC, 对各自成熟肽协助作用的分子机制也不尽相同. 如贾焱等^[10-11]的工作表明, subtilisin E 和 NK 同属 subtilisin 家族, 两者的 IMC 高度保守, 但两者 IMC 上 Ile30 对于不同的成熟肽却有不同的功能, 造成这种现象的原因可能是两个成熟肽的序列有差别, 导致类似“脚手架”的 IMC 必须与成熟肽很好地齿合. 因此, 研究不同蛋白质的 IMC 分子机制, 确定 IMC 上哪些残基通过协同作用引导成熟肽折叠, 均有重要意义.

2.2 应用意义

传统的蛋白质工程是研究蛋白质发挥功能的结构域的关键残基, 再利用分子生物学或物理化学的方法有目的地进行改造. 对 IMC 分子机制的研究使得在蛋白质折叠阶段对其改造成为可能: 确定 IMC 上通过协同作用执行 IMC 功能的重要残基, 改变或修饰其侧链来改造 IMC, 进而影响成熟肽的结构和功能, 达到改造目的. 因此, 对 IMC 分子机制的研究可拓展传统的蛋白质工程.

3 IMC 研究的挑战

随着对 IMC 协助蛋白质折叠机制的关注, 目

前已有很多进展, 但依然面临一些挑战.

3.1 难以研究天然状态下 IMC 对成熟肽的作用机制

目前对于 IMC 的研究, 多采用 *E. coli* 的表达系统来获得蛋白. 由于此表达系统的高效性, 导致蛋白质表达时易形成包涵体. 因此, 目前对于 IMC 的作用机制研究绝大多数是基于蛋白质的复性过程, 天然状态下细胞中的大分子拥挤环境被忽略, 且天然状态下的蛋白质一旦被表达, 就开始了折叠, 而体外复性过程则是蛋白质完成表达之后, 才开始的折叠, 因此相关结论可能与天然状态不同.

贾焱等^[10-11]经过对不同质粒的筛选, 寻找到 pET26b(+)这一可对 NK 进行表达后分泌的质粒, 能得到天然状态下折叠的 NK, 研究野生型及突变体 IMC 的成熟肽折叠的影响. 结果表明, 天然状态下折叠的 NK 与体外复性 NK 的结构稍有差异, 酶活也有变化, 证明天然状态下 IMC 协助的折叠机制与体外复性时可能不同, 可能是由于天然状态下的大分子拥挤环境或蛋白的起始折叠时间不同导致的.

3.2 难以获得 IMC 与成熟肽复合体的晶体结构

确定一段肽是否为 IMC, 最直接的研究方法就是捕捉到它与成熟肽的复合体晶体结构, 并研究相互作用模式. 而 IMC 协助折叠的速度较快, 在成熟肽折叠成熟后它又被马上降解, 所以晶体结构难以获得. 目前的解决方法是突变成熟肽的活性中心, 使成熟肽失活, 从而使 IMC 与成熟肽停留在复合体状态, 并进一步获得晶体结构, 或将单独表达的 IMC 与折叠完成的成熟肽一起加入缓冲液, 再获得复合体晶体结构. 这些方法可能会改变 IMC 与成熟肽的相互作用模式, 因此结论可能与天然状态不同.

贾焱等^[10-11]运用同源模建和分子动力学模拟的方法, 构建了 NK 的 IMC 与成熟肽的复合体模型, 此法可以解释一些现象, 如分析 NK 的 IMC 上有哪些残基与成熟肽有直接的氢键相互作用, 但进一步探索 NK 活性中心与成熟肽的相互作用时则很困难, 由于此模型是基于 subtilisin E 的 IMC 与成熟肽的复合体晶体结构, 它的获得是通过突变 subtilisin E 的活性中心而停留在复合体状态, 因此在 NK 的成熟肽与 IMC 复合体模型上, 无法得到真实的 IMC 与活性中心的相互作用模式. 这可能是长期阻碍 IMC 机制研究的一个难点.

4 前景展望

IMC 协助的蛋白质折叠机制与 Crick 的推测和 Anfinsen 原则不同, 表明某些蛋白质的正确折叠需要 IMC 提供额外的立体结构信息. 在原核生物、真核生物及病毒中都发现了此种现象, 说明了这是一种广泛的蛋白质折叠方式, 其优势在于: 对于第一类 IMC, 它既能提供一个相对封闭的环境, 又能以“脚手架”提高正确折叠的概率; 对于第二类 IMC, 则可引导多聚体的形成, 抑制错误聚集. 因此, IMC 能提供比分子伴侣更契合的结构, 更有效地引导成熟肽折叠, 是一种更优的折叠策略.

最近, Yan 等^[30]又发现了一种新的 IMC 协助蛋白质折叠的方式. β/γ -晶状体球蛋白是哺乳动物晶状体的主要结构蛋白, 人眼中 β B1-晶状体球蛋白的 N 端肽段与 β -晶状体球蛋白的大小有重要关系, Yan 等研究了前者对 β B1 折叠及结构的影响, 发现缺失 28 个氨基酸残基的 N 端肽段可促进二聚体 β B1 解离为单体, 表明其 N 端肽段可执行 IMC 的功能引导 β B1 的多聚化. 同时, 它可协助晶状体中特异的分子伴侣 α A-晶状体球蛋白发挥作用, 这种协助蛋白质折叠的作用比 IMC 或分子伴侣的单独协助作用更强, 这也是第一个发现的 IMC 与分子伴侣同时协助蛋白质折叠的实例. 此工作不仅揭示了 β B1 的 N 端肽段的作用, 同时也证明了最近关于蛋白质折叠的猜想, 即蛋白质的柔性末端对于其折叠和功能都有至关重要的作用.

翁美芝、蔡永君的工作^[31-32]发现 NK 的 IMC 上一些点突变可导致 NK 结构和酶活的变化, 说明用突变 IMC 的方法改造 NK 的可行性. 随着对不同蛋白质折叠研究的积累, 将会有不同的 IMC 协助机制被发现, 研究结果将丰富蛋白质的折叠理论, 同时可拓展蛋白质工程.

参 考 文 献

- [1] Crick F H. On protein synthesis. Symp Soc Exp Biol, 1958, **12**(XII): 138-163
- [2] Anfinsen C B. Principles that govern the folding of protein chains. Science, 1973, **181**(4096): 223-230
- [3] Hayer-Hartl M, Bracher A, Hartl F U. The GroEL-GroES chaperonin machine: A nano-cage for protein folding. Trends Biochem Sci, 2015. doi: 10.1016/j.tibs.2015.07.009
- [4] Chen Y J, Inouye M. The intramolecular chaperone-mediated protein folding. Current Opinion in Structural Biology, 2008, **18**(6): 765-770
- [5] Falzon L, Patel S, Chen Y J, *et al.* Autotomic behavior of the propeptide in propeptide-mediated folding of prosubtilisin E. J Mol Biol, 2007, **366**(2): 494-503
- [6] Tanaka S, Saito K, Chon H, *et al.* Crystal structure of unautoprocessed precursor of subtilisin from a hyperthermophilic archaeon: evidence for Ca^{2+} -induced folding. J Biol Chem, 2007, **282**(11): 8246-8255
- [7] Shinde U P, Liu J J, Inouye M. Protein memory through altered folding mediated by intramolecular chaperones. Nature, 1997, **389**(6650): 520-522
- [8] Bath K, Lee F. Variant BDNF (Val66Met) impact on brain structure and function. Cogn Affect Behav Neuro Sci, 2006, **6**(1): 79-85
- [9] Yabuta Y, Takagi H, Inouye M, *et al.* Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone- propeptide release modulates activation precision of pro-subtilisin. J Biol Chem, 2001, **276**(48): 44427-44434
- [10] Jia Y, Liu H, Zou G, *et al.* Functional analysis of propeptide as an intramolecular chaperone for *in vivo* folding of subtilisin natto kinase. FEBS Letters, 2010, **584**(23): 4789-4796
- [11] Jia Y, Cao X, Zou G, *et al.* Four residues of propeptide are essential for precursor folding of natto kinase. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2014, **46**(11): 957-964
- [12] Yabuta Y, Takagi H, Inouye M, *et al.* Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone-propeptide release modulates activation precision of pro-subtilisin. J Biol Chem, 2001, **276**(48): 44427-44434
- [13] Zha D, Zhang H, Yan Y, *et al.* N-terminal transmembrane domain of lipase LipA from *Pseudomonas protegens* Pf-5: A must for its efficient folding into an active conformation. Biochimie, 2014, **105**(10): 165-171
- [14] Dong S, Wei T D, Zhang Y Z, *et al.* Molecular insight into the role of the N-terminal extension in the maturation, substrate recognition, and catalysis of a bacterial alginate lyase from polysaccharide lyase family 18. J Biol Chem, 2014, **289**(43): 29558-29569
- [15] Kobayashi H, Yoshida T, Tsuge H, *et al.* Structural basis for action of the external chaperone for a propeptide-deficient serine protease from *aeromonas sobria*. J Biol Chem, 2015, **290**(35): 11130-11143
- [16] Nagayama M, Kuroda K, Ueda M. Identification of interaction site of propeptide toward mature carboxypeptidase Y (mCPY) based on the similarity between propeptide and CPY inhibitor (IC). Biosci Biotechnol Biochem. 2012, **76**(1): 153-156
- [17] Nagayama M, Maeda H, Kuroda K, *et al.* Mutated intramolecular chaperones generate high-activity isomers of mature enzymes. Biochemistry. 2012, **51**(17): 3547-3553
- [18] Satomura A, Kuroda K, Ueda M. Generation of a functionally distinct rhizopus oryzae lipase through protein folding memory. PLoS One, 2015, **10**: e0124545
- [19] Kliemann M, Rattenholl A, Golbik R, *et al.* The mature part of proNGF induces the structure of its pro-peptide. FEBS Lett, 2004, **566**(1-3): 207-212
- [20] Nykjaer A, Lee R, Teng K K, *et al.* Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. Nature, 2004, **427** (6-7): 843-848

- [21] Min C Y, Qiao Z S, Feng Y M. Unfolding of human proinsulin. Intermediates and possible role of its C-peptide in folding/unfolding. *Eur J Biochem*, 2004, **271**(9): 1737–1747
- [22] Munte C E, Vilela L, Kalbitzer H R, *et al.* Solution structure of human proinsulin C-peptide. *FEBS J*, 2005, **272**(16): 4284–4293
- [23] He H W, Feng S, Yan Y B. Role of the linker between the N- and C-terminal domains in the stability and folding of rabbit muscle creatine kinase. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, **39**(10): 1816–1827
- [24] Chen Z, Chen X J, Xia M, *et al.* Chaperone-like effect of the linker on the isolated C-terminal domain of rabbit muscle creatine kinase. *Biophys J*, 2012, **103**(3): 558–566
- [25] Suhanovsky M M, Teschke C M. An intramolecular chaperone inserted in bacteriophage P22 coat protein mediates its chaperonin-independent folding. *J Biol Chem*, 2013, **288** (47): 33772–33783
- [26] Rosenberg J B, Haberichter S L, Jozwiak M A, *et al.* The role of the D1 domain of the von Willebrand factor propeptide in multimerization of VWF. *Blood*, 2002, **100**(5): 1699–1706.
- [27] Stummeyer K, Dickmanns A, Muhlenhoff M, *et al.* Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, **12**(1): 90–96
- [28] Muhlenhoff M, Stummeyer K, Grove M, *et al.* Proteolytic processing and oligomerization of bacteriophage-derived endosialidases. *J Biol Chem*, 2003, **278**(15): 12634–12644
- [29] Schwarzer D, Stummeyer K, Gerardy-Schahn R, *et al.* Characterization of a novel intramolecular chaperone domain conserved in endosialidases and other bacteriophage tail spike and fiber proteins. *J Biol Chem*, 2007, **282**(5): 2821–2831.
- [30] Leng X Y, Wang S, Yan Y B, *et al.* The N-terminal extension of β B1-crystallin chaperones β -crystallin folding and cooperates with α A-crystallin. *Biochemistry*, 2014, **53**(15): 2464–2473.
- [31] Cai Y, Bao W, Zou G, *et al.* Directed evolution improves the fibrinolytic activity of nattokinase from *Bacillus natto*. *FEMS Microbiol Lett*, 2011, **325**(2): 155–161
- [32] Weng M, Deng X, Zou G, *et al.* Improving the activity of the subtilisin nattokinase by site-directed mutagenesis and molecular dynamics simulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, **465**(3): 580–586

Research Progress on The Mechanism of Intramolecular Chaperone*

JIA Yan^{1)**}, SUN Ying-Jie¹⁾, HE Cong-Fen¹⁾, TANG Shuang-Yan²⁾, ZHU En-Guang¹⁾

¹⁾ Beijing Key Laboratory of Plants Resource Research and Development, School of Science, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;

²⁾ CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Folding of some proteins in prokaryote, eukaryote and virus is contrary to Anfinsen's dogma: Their structure is not determined by the protein's amino acid sequence. However, the proper folding of them requires the assistance of intramolecular chaperone (IMC). On the basis of different mechanism, IMC can be classified into two categories. The type I IMC assists the tertiary structure formation, and the type II IMC guides the assembly of quaternary structure to form the functional protein complex. IMC guides the protein folding more effectively than molecular chaperone. This mechanism is a better strategy for protein folding. Study on IMC mechanism not only can determine the essential residues on the guidance of mature peptide folding, but also can modify these residues to change mature peptide. This is a novel approach of protein engineering.

Key words intramolecular chaperone, mature peptide, protein folding, spatial structure, molecular mechanism
DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0387

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(31501415).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-68984937, E-mail: jiayan@btbu.edu.cn

Received: January 4, 2016 Accepted: March 15, 2016