

综述 Reviews

核苷酸转换因子的特性及其在植物中的研究现状

张景霞, 杨颖, 张权, 夏广亮, 刘箭*

山东师范大学生命科学学院, 济南250014

摘要: 热激蛋白HSP70是一类细胞必需的具有ATPase活性的分子伴侣。ADP的脱离是HSP70分子伴侣体系能够完成其功能循环的限速步骤, 该反应步骤由核苷酸交换因子(NEFs)加速, 因此, NEFs是HSP70分子伴侣体系中的一类关键辅助因子。本文总结了有关NEFs的研究成果以及植物NEFs的最新研究进展。

关键词: HSP70; ATPase循环; 分子伴侣; NEFs

Characteristic of the Nucleotide Exchange Factors and Recent Studies in Plants

ZHANG Jing-Xia, YANG Ying, ZHANG Quan, XIA Guang-Liang, LIU Jian*

College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China

Abstract: Heat shock protein 70 (HSP70) is a class of essential molecular chaperone and possesses ATPase activity. The release of ADP from HSP70 is the speed limit step of the function cycle of HSP70 molecular chaperone system, and is accelerated by nucleotide exchange factors (NEFs). Therefore, NEFs are the key co-chaperones in HSP70 molecular chaperone system. This review summarizes the previous achievements in knowledge on the NEFs as well as the current studies in plant NEFs.

Key words: HSP70; ATPase cycles; molecular chaperone; NEFs

热激蛋白HSP70是进化上高度保守且具备ATPase活性的分子伴侣, 其结构包括两个主要的功能区: N端的核苷酸结合区(nucleotide binding domain, NBD)和C端的多肽结合区(peptide-binding domain, PBD)。NBD由lobe I和lobe II两个球形亚结构组成, 每个亚结构又分为A、B两区。ATP结合在lobe I、lobe II形成的深沟底部, 可被HSP70水解成ADP。PBD由 β -PBD区和 α -PBD区组成(Mayer和Bukau 2005), 底物结合在 β -PBD区形成的“口袋”中, α -PBD作为“盖子”, 控制底物的结合与释放。在J-蛋白(HSP70的辅助分子伴侣)和底物的刺激下, HSP70将ATP水解为ADP, α -PBD“盖子”闭合, 底物牢固的结合在HSP70上(Harrison等1997); 随后, 在核苷酸转换因子(nucleotide exchange factors, NEFs)的协助下, ADP脱离HSP70, 体内高浓度的ATP(相对于ADP浓度)又重新结合在HSP70上, 完成HSP70·ADP向HSP70·ATP的转换, α -PBD“盖子”打开, 修复的底物脱离HSP70, 完成ATPase的一个循环(图1)。

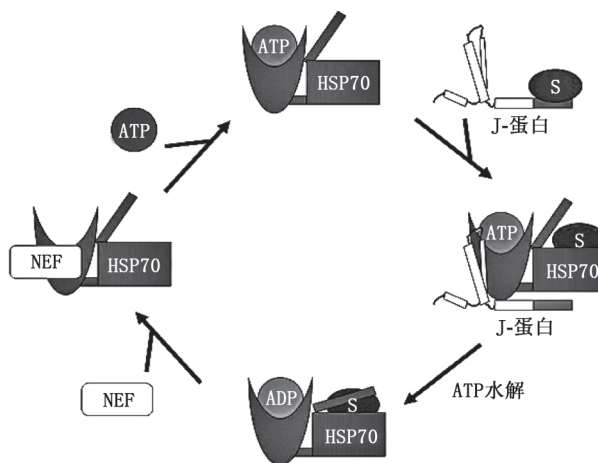


图1 HSP70的ATPase循环示意图(Wright 2007)

Fig.1 The cycle of HSP70 ATPase

在生物体内, ADP的脱离是HSP70完成ATPase

收稿 2010-10-25 修定 2011-02-25

资助 国家自然科学基金(30970233)。

* 通讯作者(E-mail: ljlsd2002@gmail.com; Tel: 0531-86180797)。

循环、发挥其分子伴侣功能的限速步骤。在HSP70复合物中, J-蛋白和底物刺激HSP70的ATPase活性, 将ATP水解成为ADP, 而ADP脱离HSP70则需要NEFs的协助。大肠杆菌缺失其NEF (GrpE), 导致HSP70的ATPase循环停止在HSP70·ADP的状态, 不能进入下一轮循环, HSP70的分子伴侣功能被抑制, 并导致细胞代谢异常; 再如, 酵母缺失胞质HSP70的NEF (Fes1p), 导致酵母在高温下不能存活(Raviol等2006); 人类细胞缺失SIL1 (内质网HSP70的NEF)则会导致神经退行性疾病(Senderek等2005)。根据NEFs与HSP70的结合方式以及促进ADP脱离的方式不同, 可将NEFs分为4类, 它们是原核细胞中的GrpE (GroP-like gene E) (Liberek等1991)、真核细胞中的BAG (Bcl-2-associated athanogene)蛋白(Xu等2008; Gassler等2001)、HspBP1 (HSP70-binding protein 1) (Kabani等2002)和HSP110 (heat shock protein 110) (Dragovic等2006a)。本文将对NEFs的特性以及植物NEFs的研究进展作一概述。

1 GrpE

GrpE是最早被发现具有NEF活性的辅助分子伴侣蛋白(Harrison 2003)。大肠杆菌GrpE受胁迫诱导表达, 且是耐受高温胁迫所必需的蛋白。GrpE由位于N端的无序片段区、螺旋发夹区(包括一个长 α -螺旋和一个短 α -螺旋)和C端的 β -折叠区组成, 以同型二聚体的形式存在(Harrison等1997)。在进行核苷酸转换的过程中, DnaK (大肠杆菌HSP70)与GrpE的一个单体结合, 该单体的 β -折叠区通过疏水作用与DnaK的核苷酸深沟结合使NBD区形成开放构象, 降低ADP与深沟的亲合力

(Harrison等1997), 导致ADP脱离DnaK, 同时也促进底物脱离DnaK (图2)。当温度升高时, GrpE螺旋发夹区的长 α -螺旋(形成GrpE二聚体的重要结构)的结构变得松散, 导致其NEF活性降低, 延长了底物结合在ADP·DnaK复合物上的时间, GrpE可将温度信息传递到DnaK上, 因此, GrpE也被称为DnaK/DnaJ/GrpE分子伴侣系统的“感温器”(thermosensor) (Gelinas等2003)。

2 BAG蛋白

BAG蛋白是一类保守性较高的多功能蛋白家族, 典型代表是Bag-1。Bag-1是抗细胞凋亡蛋白Bcl-2的结合蛋白, 它是BAG蛋白家族中最早被发现的成员(Takayama等1995)。在Bag-1的C末端含有BAG功能区, 此功能区由110~124个氨基酸残基组成, 形成3个反向平行的螺旋结构(Schuermann等2008)。借助BAG功能区的螺旋1的稳定作用, 螺旋2和3通过静电力结合在HSC70 (组成型表达的HSP70)上, 使lobe IIb向外翻转14° (图2), NBD区的核苷酸结合位点被破坏, 导致ADP与HSC70的亲合力降低, 促使ADP脱离。虽然Bag-1与GrpE无同源性, 但它们都是利用将lobe IIb旋转打开, 从而促进ADP脱离的方式完成核苷酸的转换。除具NEF功能外, Bag-1还有调节Raf-1 (rapidly growing fibrosarcoma kinase 1)活性(Song等2001)、调节男性激素受体的活性(Froesch等1998)、解除Siah介导的细胞生长抑制、调节神经元细胞的生长和分化以及在蛋白降解中起重要作用(Alberti等2002; Luders等2000)等。

Bag-2是BAG家族中具有NEF功能的另一成员。与Bag-1的BAG区不同, Bag-2具有新型BAG

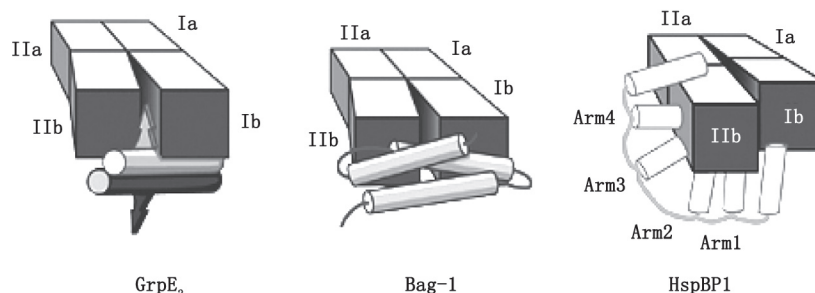


图2 核苷酸转换方式示意图(Bukau等2006)

Fig.2 Schematic models of the nucleotide exchange mechanisms

Ia、Ib、IIa、IIb: HSP70的NBD区; GrpE₂: GrpE二聚体; Arm1~4: HspBP1的ARM功能区。

区——BNB (**brand new bag**)区(Xu等2008)。BNB区由两个反向平行的长 α -螺旋和连接它们的linker(包括一环状结构和一个短螺旋)组成。Bag-2通过linker与HSC70的lobe Ib和lobe Iib结合,使lobe II作为一个整体旋转 10° 打开,促进ADP脱离HSC70(Xu等2008)。除具有NEF功能外, Bag-2还具有抑制CHIP (**c**arboxy **t**erminus of **H**sp70-**i**nteracting **p**rotein)的泛素连接酶活性、促进CFTR (**c**ystic **f**ibrosis **t**ransmembrane **c**onductance **r**egulator)成熟(Arndt等2005)等作用。

3 HspBP1

HspBP1是真核生物的另一类NEF。HspBP1的核心功能区为ARM功能区(**a**rmadillo **r**epeat **d**omains),是由4个约含有40个氨基酸残基的ARM基序(**a**rm **r**epeats)串联组成的超螺旋结构。ARM功能区形成的凹陷的表面从一侧将NBD的lobe Iib包裹起来,使整个lobe II与lobe I分离,并将lobe Iib稳定在向外翻转的开放状态,从而促进核苷酸脱离(Shomura等2005);而GrpE、BAG蛋白则与NBD的lobe Ib、lobe Iib同时结合,但仅使lobe II的b区(即lobe Iib)的构象发生变化(图2),因此HspBP1促进ADP脱离的方式与GrpE、BAG蛋白不同。Fes1p是酵母中的HspBP1的同系物,也具有ARM功能区,与HSP70的结合方式可能与HspBP1/HSP70的结合方式相同(Dragovic等2006b; Shomura等2005)。除NEF功能外, Fes1p与RAC (**r**ibosome-**a**ssociated **c**omplex)竞争结合Ssb1p,说明Fes1p在Ssb1p参与的蛋白质翻译过程中也有重要作用(Dragovic等2006b)。

4 HSP110

HSP110是在真核细胞胞质中新发现的NEF(Dragovic等2006a)。HSP110属于HSP70超家族(Morano 2007),同样具有NBD和PBD功能区(Shaner和Morano 2007)。与DnaK的 α -PBD覆盖在 β -PBD上形成“盖子”的构象不同, HSP110的 α -PBD、 β -PBD区逆向分布在NBD两侧(Polier等2008)。Sse1p是酵母中HSP110的同系物,其lobe Ia、Ib、IIa、Iib分别与HSP70的IIa、Iib、Ia、Ib结合, Sse1p的 α -PBD区紧密结合HSP70的lobe Iib一侧,使lobe Iib旋转 27° 打开,破坏核苷酸结合位点,导致ADP脱离(Polier等2008)。在促进核苷酸

转换的方式上, HSP110与GrpE、BAG蛋白类似,都是使HSP70的lobe Iib发生旋转形成开放的构象,只是HSP110使lobe Iib翻转的开角更大一些。除NEF活性外, HSP110可将变性蛋白维持在可折叠状态,参与细胞抗热(Oh等1997),以及帮助蛋白底物脱离HSP70(Polier等2008)等。

5 植物NEFs的研究现状

迄今, NEFs的研究多集中在原核生物、酵母和动物中,关于植物NEFs的报道并不多。已有研究表明,植物细胞中存在上述NEFs的同源物,它们能够结合HSP70,可能具有NEF活性,并对HSP70功能进行调控。

植物线粒体和叶绿体中存在大肠杆菌GrpE的同源蛋白。Padidam等(1999)首次报道了烟草线粒体中存在GrpE的同源蛋白——NtmGrpE, NtmGrpE可与线粒体mHSP70结合, ATP对结合有抑制作用。此外,分子进化数据表明, GrpE的同源蛋白还存在于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和烟草(*Nicotiana tabacum*) (Padidam等1999)等物种中。叶绿体中的GrpE同源物为CGE1,它存在于豌豆(*Pisum sativum*) (Schlicher和Soll 1997)、小立碗藓(*Physcomitrella patens*) (Hofmann和Theg 2004)和衣藻(*Chlamydomonas*) (Schroda等2001)等物种中。衣藻中的CGE1具有与GrpE相似的功能(Schroda等2001),是热诱导表达蛋白,在没有ATP的条件下,衣藻CGE1可与叶绿体基质中的HSP70B或大肠杆菌DnaK结合,形成复合物。在大肠杆菌*grpe*突变体中过量表达衣藻CGE1蛋白,大肠杆菌*grpe*突变体的热敏感表型可以被修复,表明衣藻CGE1跟大肠杆菌GrpE在功能上是互补的。

BAG基因存在于辣椒(*Capsicum annuum*)、小麦(*Triticum aestivum*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、高粱(*Sorghum bicolor*)、苜蓿(*Medicago sativa*)、大豆(*Glycine max*) (Kabbage和Dickman 2008)和拟南芥(Doukhanina等2006)等植物中。拟南芥BAG基因家族(*AtBag*)共有7个基因(Doukhanina等2006), *AtBag1~4*定位在细胞质中, *AtBag6、7*定位于细胞核中, *AtBag5*定位于线粒体中。拟南芥BAG蛋白的C端都含有BAG功能区。Doukhanina等(2006)将*AtBAG*、哺乳动物BAG蛋白的BAG功能区的序列进行比对发现,它们与HSP70结合的关键氨基酸残基

具保守性,表明AtBAG蛋白结合HSP70的方式可能与哺乳动物BAG蛋白类似, Pull-down和酵母双杂交证实了AtBag4可以与AtHSP70结合,并可能调控AtHSP70的功能。但AtBag是否具有NEF功能还没有实验证据。

本实验室对拟南芥中酵母Fes1p的同系物,即AtFes1A进行了研究(Zhang等2010),发现AtFes1A定位在细胞质中,受高温诱导表达, Pull-down和免疫共沉淀证明, AtFes1A可与胞质型HSC70特异结合, ADP可以促进这种结合,而ATP则具有抑制作用, AtFes1A对核苷酸种类的依赖性与酵母Fes1p以及动物HspBP1一致;在缺失Fes1p的酵母突变体中表达AtFes1A基因,突变酵母株系的高温敏感性得到修复,说明AtFes1A蛋白与酵母Fes1p蛋白在功能上互补(Zhang等2010); T-DNA插入失活的*atfes1a*突变体发育正常,但呈现对高温敏感的表现型(Zhang等2010),将萤光酶基因转入突变体*atfes1a*和野生型拟南芥中,高温处理后*atfes1a*突变体内萤光酶更易被高温灭活,复性速度更慢,表明缺失AtFes1A后,拟南芥的分子伴侣系统受损。以上结果均暗示, AtFes1A可能是拟南芥细胞质HSC70的NEF。

拟南芥基因组中,有4个编码HSP110蛋白的基因(Lin等2001)。HSP110在常温下有表达,受高温上调明显。在获得耐热性实验中,拟南芥*hsp110*突变体表现出明显的敏感表现型,说明在拟南芥耐热过程中HSP110具有重要作用(Larkindale和Vierling 2008)。但拟南芥HSP110是否具有NEF活性尚未见报道。

6 结语

相对于原核生物、酵母和动物HSP70的NEFs研究,植物NEFs相关的报道很少。我们认为植物NEFs的研究面临以下两个难题:首先,许多研究小组尝试植物HSP70的原核表达,但均没有成功,如果从植物组织中纯化植物HSP70,又无法得到有活性的、高纯度的、单一亚型的HSP70,这无疑增加了鉴定胞质HSP70的NEFs的难度;其次,植物HSP70的ATPase循环除J-蛋白和NEFs外,可能还依赖于某种未知的植物特异性的辅助因子,在植物HSP70的NEFs体外分析体系中,由于缺乏此类因子,导致检测不到NEF活性。随着植物分子生物学

方法的快速发展和新基因功能的不断发现,植物NEFs的研究定将取得突破性的研究成果。

参考文献

- Alberti S, Demand J, Esser C, Emmerich N, Schild H, Hohfeld J (2002). Ubiquitylation of BAG-1 suggests a novel regulatory mechanism during the sorting of chaperone substrates to the proteasome. *J Biol Chem*, 277: 45920~45927
- Arndt V, Daniel C, Nastainczyk W, Alberti S, Hohfeld J (2005). BAG-2 acts as an inhibitor of the chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP. *Mol Biol Cell*, 16: 5891~5900
- Bukau B, Weissman J, Horwich A (2006). Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*, 125: 443~451
- Doukhanina EV, Chen S, van der Zalm E, Godzik A, Reed J, Dickman MB (2006). Identification and functional characterization of the BAG protein family in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 281: 18793~18801
- Dragovic Z, Broadley SA, Shomura Y, Bracher A, Hartl FU (2006a). Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *EMBO J*, 25: 2519~2528
- Dragovic Z, Shomura Y, Tzvetkov N, Hartl FU, Bracher A (2006b). Fes1p acts as a nucleotide exchange factor for the ribosome-associated molecular chaperone Ssb1p. *Biol Chem*, 387: 1593~1600
- Froesch BA, Takayama S, Reed JC (1998). BAG-1L protein enhances androgen receptor function. *J Biol Chem*, 273: 11660~11666
- Gassler CS, Wiederkehr T, Brehmer D, Bukau B, Mayer MP (2001). Bag-1M accelerates nucleotide release for human Hsc70 and Hsp70 and can act concentration dependent as positive and negative cofactor. *J Biol Chem*, 276: 32538~32544
- Gelinas AD, Toth J, Bethoney KA, Langsetmo K, Stafford WF, Harrison CJ (2003). Thermodynamic linkage in the GrpE nucleotide exchange factor, a molecular thermosensor. *Biochemistry*, 42: 9050~9059
- Harrison C (2003). GrpE, a nucleotide exchange factor for DnaK. *Cell Stress Chaperon*, 8: 218~224
- Harrison CJ, Hayer-Hartl M, Di Liberto M, Hartl F, Kuriyan J (1997). Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science*, 276: 431~435
- Hofmann NR, Theg SM (2004). *Physcomitrella patens* as a model for the study of chloroplast protein transport: conserved machineries between vascular and non-vascular plants. *Plant Mol Biol*, 53: 643~654
- Kabani M, McLellan C, Raynes DA, Guerriero V, Brodsky JL (2002). HspBP1, a homologue of the yeast Fes1 and Sls1 proteins, is an Hsc70 nucleotide exchange factor. *FEBS Lett*, 531: 339~342
- Kabbage M, Dickman MB (2008). The BAG proteins: a ubiquitous family of chaperone regulators. *Cell Mol Life Sci*, 65: 1390~1402
- Larkindale J, Vierling E (2008). Core genome responses involved in acclimation to high temperature. *Plant Physiol*, 146: 748~761
- Liberek K, Marszalek J, Ang D, Georgopoulos C, Zylicz M (1991).

- Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 2874~2878
- Lin BL, Wang JS, Liu HC, Chen RW, Meyer Y, Barakat A, Delseny M (2001). Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperon*, 6: 201~208
- Luders J, Demand J, Hohfeld J (2000). The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J Biol Chem*, 275: 4613~4617
- Mayer MP, Bukau B (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 62: 670~684
- Morano KA (2007). New tricks for an old dog: the evolving world of Hsp70. *Ann N Y Acad Sci*, 1113: 1~14
- Oh HJ, Chen X, Subjectk JR (1997). Hsp110 protects heat-denatured proteins and confers cellular thermoresistance. *J Biol Chem*, 272: 31636~31640
- Padidam M, Reddy VS, Beachy RN, Fauquet CM (1999). Molecular characterization of a plant mitochondrial chaperone GrpE. *Plant Mol Biol*, 39: 871~881
- Polier S, Dragovic Z, Hartl FU, Bracher A (2008). Structural basis for the cooperation of Hsp70 and Hsp110 chaperones in protein folding. *Cell*, 133: 1068~1079
- Raviol H, Sadlish H, Rodriguez F, Mayer MP, Bukau B (2006). Chaperone network in the yeast cytosol: Hsp110 is revealed as an Hsp70 nucleotide exchange factor. *EMBO J*, 25: 2510~2518
- Schlicher T, Soll J (1997). Chloroplastic isoforms of DnaJ and GrpE in pea. *Plant Mol Biol*, 33: 181~185
- Schroda M, Vallon O, Whitelegge JP, Beck CF, Wollman FA (2001). The chloroplastic GrpE homolog of *Chlamydomonas*: two isoforms generated by differential splicing. *Plant Cell*, 13: 2823~2839
- Schuermann JP, Jiang J, Cuellar J, Llorca O, Wang L, Gimenez LE, Jin S, Taylor AB, Demeler B, Morano KA et al (2008). Structure of the Hsp110: Hsc70 nucleotide exchange machine. *Mol Cell*, 31: 232~243
- Senderek J, Krieger M, Stendel C, Bergmann C, Moser M, Breitbach-Faller N, Rudnik-Schoneborn S, Blaschek A, Wolf NI, Harting I et al (2005). Mutations in *SIL1* cause Marinesco-Sjogren syndrome, a cerebellar ataxia with cataract and myopathy. *Nat Genet*, 37: 1312~1314
- Shaner L, Morano KA (2007). All in the family: atypical Hsp70 chaperones are conserved modulators of Hsp70 activity. *Cell Stress Chaperon*, 12: 1~8
- Shomura Y, Dragovic Z, Chang HC, Tzvetkov N, Young JC, Brodsky JL, Guerriero V, Hartl FU, Bracher A (2005). Regulation of Hsp70 function by HspBP1: structural analysis reveals an alternate mechanism for Hsp70 nucleotide exchange. *Mol Cell*, 17: 367~379
- Song J, Takeda M, Morimoto RI (2001). Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nat Cell Biol*, 3: 276~282
- Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, Reed JC (1995). Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell*, 80: 279~284
- Wright CM (2007). The role of molecular chaperones in yeast cell wall integrity and identification of chaperone modulators that interfere with simian virus 40 replication [Doctoral Dissertation]. Pittsburgh: University of Pittsburgh
- Xu Z, Page RC, Gomes MM, Kohli E, Nix JC, Herr AB, Patterson C, Misra S (2008). Structural basis of nucleotide exchange and client binding by the novel Hsp70-cochaperone Bag2. *Nat Struct Mol Biol*, 15: 1309~1317
- Zhang JX, Wang C, Yang CY, Wang JY, Chen L, Bao XM, Zhao YX, Zhang H, Liu J (2010). The role of *Arabidopsis AtFes1A* in cytosolic Hsp70 stability and abiotic stress tolerance. *Plant J*, 62: 539~548