

热激蛋白 ClpB 的结构和功能

杨金莹 孙爱清 刘箭*

山东师范大学生命科学学院, 济南 250014

The Structure and Function of Heat Shock Protein ClpB

YANG Jin-Ying, SUN Ai-Qing, LIU Jian*

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

摘要 ClpB 是 HSP100/Clp 蛋白家族的一员, 具有分子伴侣功能, 通过溶解热胁迫下的蛋白聚集体, 减少热激对细胞的伤害, ClpB 与细胞的耐热性紧密相关。近年来, ClpB 在植物中的功能成为研究的热点, 但大多局限在植物胞质 ClpB 的研究, 而对细胞器 ClpB 的研究较少。文章介绍了热激蛋白 ClpB 的结构、功能和植物热激蛋白 ClpB 的研究现状。

关键词 ClpB; 分子伴侣; 耐热性; 结构; 功能

分子伴侣(molecular chaperone)是生物体内一类与其他构像不稳定的蛋白相结合并使之稳定的蛋白, 它们通过控制、结合和释放来帮助被结合多肽在体内的折叠、组装、转运或降解等。在胁迫条件下, 分子伴侣起稳定蛋白质结构的作用, 防止蛋白质凝聚、变性, 并具有修复变性蛋白的能力(Hendtck和Hartl 1993)。

HSP100/Clp (caseinolytic protease)蛋白具备分子伴侣功能, 广泛存在于真核及原核生物中, 是 AAA⁺蛋白家族(ATPase associated with a variety of cellular activities)的一员(Ogura和Wilkinson 2001)。根据分子结构特征, HSP100/Clp 可以分为两大类: Class I 亚家族和 Class II 亚家族。Class I 亚家族成员包含2个核苷酸结合域(nucleotide binding domain, NBD), 即 NBD₁ 和 NBD₂, 根据2个 NBD 之间区域的长短又可分为 ClpA、ClpB、ClpC 和 ClpD 4 类蛋白。Class II 亚家族包括 ClpM、ClpN、ClpX 和 ClpY 4 类蛋白, 它们仅包含1个 NBD (Sotelo等2002)。ClpB作为Clp家族的一员, 它与该亚家族的其它成员最重要的区别特征是, ClpB的2个NBD间隔最长(Squires等1992) (图1)。

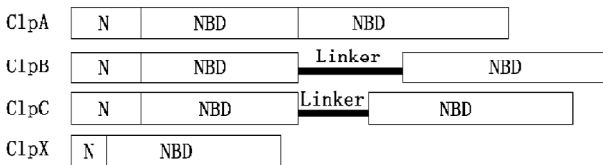


图1 Clp蛋白结构示意图

HSP100/Clp 蛋白是由多亚基组成的寡聚蛋白, 多数 Clp 蛋白(如 ClpA、ClpC、ClpX、ClpP)是 ATP 依赖型蛋白酶, 可以直接水解蛋白或介导蛋白的水解。ClpB 不具备蛋白酶结构域, 没有蛋白酶活性, 是具有 ATP 酶活性的分子伴侣, 能瓦解蛋白聚集体, 并协同其它的分子伴侣修复变性蛋白(Ogura和Wilkinson 2001)。ClpB 可受高温诱导, 是热激蛋白(heat shock protein, HSP)的一种, 根据热激蛋白的分子量大小, ClpB 属于 HSP100 家族, 因此也称为 HSP100/ClpB 蛋白。

1 HSP100/ClpB 的蛋白结构

ClpB 蛋白的一级结构包括 5 个区域: 2 个 NBD、N 末端、C 末端以及中间 Linker 区域(图2)。

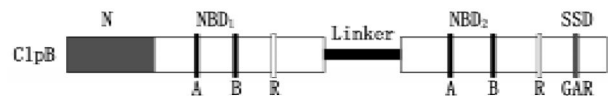


图2 ClpB结构示意图

A: Walker A; B: Walker B; R: Arg finger (精氨酸指); GAR invariant sensor 2 motif (保守的底物感知基序); SSD sensor and substrate discrimination (底物感知及识别域)。

1.1 NBD₁ 和 NBD₂ NBD₁ 和 NBD₂ 是 ClpB 蛋白的 2 个极为保守的功能区, 各有 220~250 个氨基酸残

收稿 2005-08-09 修定 2005-12-30

资助 国家自然科学基金(30270132)。

*通讯作者(E-mail: ljlstd@beelink.com, Tel: 0531-86180797)。

基(Lee等2003),每个NBD又包括核苷酸结合位点的中心区域(包括Walker A和Walker B保守域)和C末端的螺旋区域2个结构域(Bochtler等2000)。Walker A的保守序列为GXXGXGKT,其中X是可变的;Walker B的保守序列为HHHHDE,其中H是疏水残基。Walker A中的赖氨酸突变,会降低ClpB辅助荧光酶复性的效率,说明NBD是ClpB保持分子伴侣功能所必需的,ClpB的分子伴侣功能需要ATP提供能量(Lee等2003)。Watanabe等(2002)将嗜热菌(*Thermus thermophilus*)的ClpB的两个区域分别进行突变,发现Walker A主要功能是结合核苷酸和驱动分子伴侣活性,而Walker B的突变则会使NBD丧失酪蛋白激活的ATP酶活性。

1.2 Linker区 这一区域是2个核苷酸结合位点的中间区域,是Clp蛋白家族分类的依据,其中,ClpB蛋白的Linker区域最长,形成一个较长的双螺旋(coiled-coil)结构,在NBD₁和NBD₂之间的相互作用中起连接作用,是其分子伴侣功能所必需的结构域(Cashikar等2002)。Watanabe等(2002)等发现嗜热菌ClpB的Linker双螺旋结构具备柔性,在瓦解蛋白聚集体中起作用。

1.3 N末端 HSP100/ClpB蛋白N末端包含大约150个氨基酸残基,由2个相似的重序列组成,形成一个独立的功能区域,其主要功能是负责ClpB蛋白的低聚化以及瓦解蛋白聚集体(Lo等2001)。Li和Sha(2003)等研究大肠杆菌(*Escherichia coli*)中ClpB的NBD₁晶体结构时发现,ClpB的NBD₁单体结构包括11个 α 螺旋和6个 β 折叠,此外,在NBD₁的N末端还有1个由 α 螺旋和2个 β 折叠相邻而形成的特殊结构,这一结构是其它AAA⁺蛋白中所没有的结构。Tek和Zolkiewski(2002)认为N末端对于其行使分子伴侣功能是必需的,大肠杆菌ClpB的N端肽结合位点突变后,ClpB突变分子的分子伴侣活性严重丧失,但仍保存了ATP酶活性(Li和Sha 2003),但Beinker等(2002)研究嗜热菌ClpB时发现,其N末端对ATP亲和力的影响并不很大,也不影响ClpB的低聚化和蛋白构象变化,因此,他们认为N末端对于其行使分子伴侣功能并不是必需的。

1.4 C末端 Barnett等(2000)发现N末端和C末端

对于分子伴侣行使功能都是必需的,去除N末端会降低酪蛋白激活ClpB ATP酶的能力;而去除C末端则会降低ClpB的自我聚合能力,从而降低与ATP的亲和力、ClpB的ATP酶活性以及分子伴侣功能。C末端的主要功能是支持ClpB的低聚化。

2 ClpB的功能

2.1 与HSP70系统(DnaK/DnaJ/GrpE)形成多分子伴侣系统 DnaK/DnaJ/GrpE/ClpB多分子伴侣系统是Zolkiewski(1999)首次发现的,他研究体外ClpB的分子伴侣活性时发现,常规的分子伴侣系统(DnaK/DnaJ/GrpE和GroEL/GroEs)或ClpB单独都不能恢复失活的荧光素酶的活性,而ClpB与DnaK/DnaJ/GrpE协同作用时则能够通过抑制荧光酶聚集而显著地恢复变性荧光素酶的活性。大肠杆菌中仅表达DnaK/DnaJ分子伴侣系统或ClpB蛋白时,热激时仍能在细胞内产生大量不可溶蛋白,而DnaK/DnaJ系统和ClpB共同过量表达的菌株可十分有效地抑制因热激而产生的蛋白变性聚集(Kedzierska和Matuszewska 2001)。

Ben-Zvi和Goloubinoff(2001)对这一体系的作用机制提出这样的观点:认为ClpB首先瓦解蛋白聚集体,蛋白聚集体暴露出疏水位点,DnaK结合在暴露出的疏水位点上,在GroEL分子伴侣系统的帮助下,DnaK利用ATP提供的能量,释放出的聚合物溶解多肽之间错误折叠的疏水链后,蛋白质重新折叠成天然蛋白质(图3)。

除了溶解蛋白聚集体外,DnaK/DnaJ/GrpE/ClpB多分子伴侣系统还可以激活质粒复制起始蛋白。这一现象是Konieczny和Liberek(2002)在大肠杆菌中首次发现的,ClpB/DnaK/DnaJ/GrpE体系的协同作用能将质粒RK₂的复制起始蛋白TrfA由无活性的二聚体变成有活性的单体形式,从而激活质粒的复制。而来自酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)线粒体的相应蛋白系统Hsp78/Ssc1/Mdj1/Mge1则不能激活TrfA蛋白。

2.2 与生物体的耐高温能力有关系 HSP100家族成员ClpB/HSP104/HSP101广泛存在于细菌、酵母和植物中,其家族成员的表达模式多为热诱导型,对生物体的基础耐热性和获得耐热性有重要意义(Kitagawa等1991)。ClpB缺失的大肠杆菌菌株对

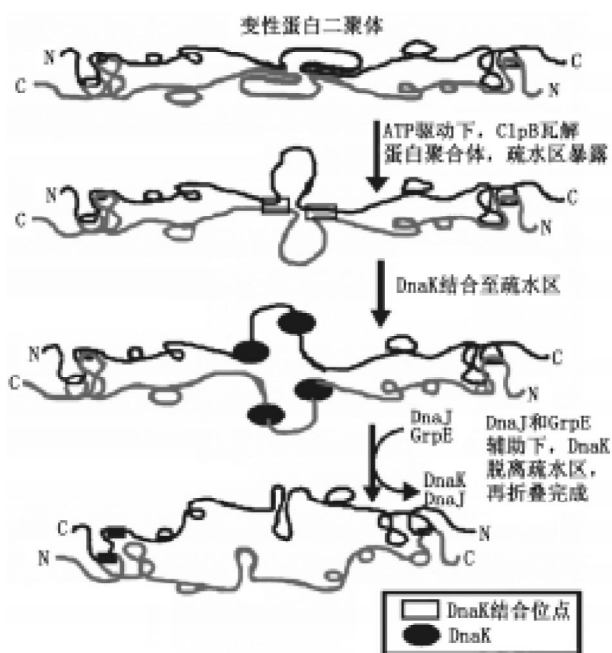


图3 ClpB与DnaK/DnaJ/GrpE (HSP70) 协同修复变性蛋白示意

突然热激抗性大大降低, 但仍有获得耐热性的能力(Krzewska等2001), 即预先经非致死高温处理后可以获得抵御致死高温的能力, 说明在大肠杆菌中ClpB仅影响了基础耐热性, 但对细胞的获得耐热性没有作用。

酵母热激蛋白HSP104/ClpB和它的同系物是首先证明为细胞获得耐热性的必需蛋白因子。酿酒酵母细胞质HSP104/ClpB突变株对温度骤升的抗性没有明显的变化, 但丧失了对以逐步升温方式处理的高温抗性(Sanchez等1992), 说明酵母HSP104/ClpB并非基础耐热性因子, 而是获得耐热性的必需因子(Squires等1991)。大肠杆菌和酵母ClpB突变株的基础耐热性和获得耐热性变化不同, 说明热胁迫条件下ClpB在真核和原核生物中的作用不同。

3 ClpB的作用底物

有研究证明, 无结构多肽如酪蛋白或多聚左旋赖氨酸(poly-L-lysine)均可以激活ClpB的ATP酶活性, 因此可能是ClpB的作用底物。Struba等(2003)的实验证明, 过量的 α -酪蛋白可刺激ClpB两个NBD区水解ATP, 并可抑制对ClpB依赖的

凝集蛋白的溶解; 相反, 多聚左旋赖氨酸只刺激第二NBD区的ATP酶活性, 并增加ClpB的解聚活性, 因此推断多聚左旋赖氨酸不能作为底物, 可能仅是提高ClpB分子伴侣活性的影响因素。

4 高等植物中的ClpB

植物HSP101是定位于植物细胞胞质的ClpB蛋白家族成员(Sotelo 2002), 现已在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、大豆(*Glycine max*)、玉米(*Zea mays*)、小麦(*Triticum aestivum*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)和利马豆(*Phaseolus lunatus*) (Park等1993; Lee等1994; Schirmer等1994; Wells等1998)中克隆到胞质HSP101/ClpB, 分子进化分析表明它们的序列高度保守。胞质型HSP101/ClpB是植物抗高温的必需蛋白(Hong和Vierling 2001)。大豆(Schirmer等1994)和拟南芥(Wells等1998)HSP101/ClpB均可以恢复酵母Hsp104/ClpB突变体表型, 使突变体恢复获得耐热性, 这表明高等植物HSP101/ClpB与酵母HSP104/ClpB在功能上可以互补。Hong和Vierling (2001)在拟南芥中分离到Hsp101/ClpB等位基因位点hot1-1。hot1-1的错义突变严重影响拟南芥幼苗对高温的耐受性, 并降低其萌发的种子耐受高温的能力, 说明HSP101是拟南芥耐受高温胁迫的因子。此外, 过量表达HSP101/ClpB的转基因水稻(*Oryza sativa*)的耐热性高于未转基因的水稻, 也说明植物HSP101/ClpB是植物抵抗高温的因子(Katiyar-Agarwal等2003)。除在抗热胁迫中发挥作用外, 植物HSP101还可能与抵抗其它环境胁迫有关。Campbell等(2001)从小麦中克隆到2个Hsp101基因, 发现小麦Hsp101 mRNAs除了受热胁迫诱导外, 还受脱水、干旱和ABA诱导, 但不受冷和伤害的影响, 表明小麦HSP101还与干旱反应有关。Singla等(1998)等发现, 盐胁迫下水稻HSP101大量增加, 而在冷和干旱胁迫下仅微弱增加, 但植物Hsp101/ClpB在抵抗(非高温)环境胁迫中的作用还不清楚。Henics等(1999)在小麦中发现了一种分子量为102 kDa的ClpB蛋白, 此蛋白可以结合在烟草花叶病毒(TMV) 5'端前导序列 Ω 上, 这种结合可能会影响mRNA调控蛋白的相互作用, 从而控制它们的稳定性和翻译能力。

最近, 叶绿体ClpB的功能也引起许多学者的重视。Eriksson和Clarke (1996)在蓝藻(*Synechococcus* sp)中发现, ClpB通过降低PS II对热的敏感而直接影响光合生物获得耐热性的能力, 他们认为这种对蓝藻光合的热保护功能可能源于ClpB的分子伴侣活性。目前对植物叶绿体ClpB的研究报道较少, 克隆的叶绿体型ClpB基因也不多。Agarwal等(2001)用分子系统进化方法分析了拟南芥HSP100/ClpB家族, 发现拟南芥Hsp100/ClpB家族共有8个基因, 其中3个定位于细胞质, 5个可能定位于质体。5个可能定位质体的基因中有2个基因(基因号: At5g15450和At2g25140)的表达产物定位于叶绿体, 但至今还未见到拟南芥质体型Hsp100/ClpB的报道。Sharon等(2000)首次在高等植物利马豆中克隆到HSP109/ClpB, 预测该蛋白定位于叶绿体, 并推测该蛋白的表达可能与植物热适应过程中叶绿体结构和功能的维持有关, 但对它的确切功能尚未见报道。我们曾从番茄(*Lycopersicon esculentum*)中克隆了叶绿体型HSP110/ClpB基因(基因号: AB219939), 初步研究表明, 该基因是植物获得耐热性的关键基因之一。相对植物细胞质型HSP101/ClpB, 植物叶绿体型HSP110/ClpB克隆的基因较少, 这方面的研究刚刚起步, 预计后者的功能将会成为今后研究的热点。

5 结语

早期对HSP100/ClpB的研究大多停留在原核生物, 至今, 原核生物中ClpB的结构和功能已经比较清楚。近年来, 植物HSP100/ClpB的研究也成为热点之一, 定位胞质的HSP101/ClpB已经在拟南芥、大豆、小麦、烟草及利马豆等植物中发现, 它们在植物抵抗高温胁迫中的作用也得到初步研究。高等植物的细胞器在植物体中具有重要作用, 植物在遭受逆境胁迫时细胞器的保护尤为重要, 而热激蛋白ClpB在植物细胞器中的定位及功能的研究相对滞后, 这就为我们留下了很大的研究空间。

植物对高温以及其它逆境胁迫的响应是一个多基因控制的复杂过程, ClpB在植物抵抗逆境胁迫中到底怎样发挥其作用? 是否与其它蛋白存在协

同? 这些问题都有待深入研究, 而这些问题的答案有助于人们深入、全面地认识ClpB在高等植物中的功能。

参考文献

- Agarwal M, Agarwal S, Sahi C, Gallie DR, Grover A (2001). *Arabidopsis thaliana* Hsp100 proteins: kith and kin. *Cell Stress Chaperon*, 6 (3): 219~224
- Barnett ME, Zolkiewska A, Zolkiewski M (2000). Structure and activity of ClpB from *Escherichia coli*. Role of the amino- and carboxyl-terminal domains. *J Biol Chem*, 275 (48): 37565~37571
- Beinker P, Schlee S, Groemping Y, Seidel R, Reinstein J (2002). The N terminus of ClpB from *Thermus thermophilus* is not essential for the chaperone activity. *J Biol Chem*, 277 (49): 47160~47166
- Ben-Zvi AP, Goloubinoff P (2001). Mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *J Struct Biol*, 135: 84~93
- Bochtler M, Hartmann C, Song HK, Bourenkov GP, Bartunik HD, Huber R (2000). The structures of HsIU and the ATP-dependent protease HsIU-HsIV. *Nature*, 403 (6771): 800~805
- Campbell JL, Klueva NY, Zheng HG, Nieto-Sotelo J, Ho TD, Nguyen HT (2001). Cloning of new members of heat shock protein HSP101 gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) *Moench* inducible by heat, dehydration, and ABA. *Biochim Biophys Acta*, 1517 (2): 270~277
- Cashikar AG, Schirmer EC, Hattendorf DA, Glover JR, Ramakrishnan MS, Ware DM, Lindquist SL (2002). Defining a pathway of communication from the C-terminal peptide binding domain to the N-terminal ATPase domain in a AAA protein. *Mol Cell*, 9: 751~760
- Eriksson MJ, Clarke AK (1996). The heat shock protein ClpB mediates the development of thermotolerance in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol*, 178 (16): 4839~4846
- Hendrick JP, Hartl FU (1993). Molecular chaperone function of heat shock proteins. *Ann Rev Biochem*, 62: 349~384
- Henics T, Nagy E, Oh HJ, Csermely P, von Gabain A, Subjeck JR (1999). Mammalian Hsp70 and Hsp110 proteins bind to RNA motifs involved in mRNA stability. *J Biol Chem*, 274 (24): 17318~17324
- Hong SW, Vierling E (2001). Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *Plant J*, 27 (1): 25~35
- Katiyar-Agarwal S, Agarwal M, Grover A (2003). Heat-tolerant basmati rice engineered by over-expression of *hsp101*. *Plant Mol Biol*, 51 (5): 677~686
- Kedzierska S, Matuszewska E (2001). The effect of co-overproduction of DnaK/DnaJ/GrpE and ClpB proteins on the removal of heat-aggregated proteins from *Escherichia coli* Δ clpB mutant cells—new insight into the role of Hsp70 in a

- functional cooperation with Hsp100. *FEMS Microbiol Lett*, 204 (2): 355~360
- Kitagawa M, Wada C, Yoshioka S, Yura T (1991). Expression of ClpB, an analog of the ATP-dependent protease regulatory subunit in *Escherichia coli*, is controlled by a heat shock σ factor (σ^{32}). *J Bacteriol*, 173: 4247~4253
- Konieczny I, Liberek K (2002). Cooperative action of *Escherichia coli* ClpB protein and DnaK chaperone in the activation of a replication initiation protein. *J Biol Chem*, 277 (21): 18483~18488
- Krzewska J, Langer T, Liberek K (2001). Mitochondrial Hsp78, a member of the Clp/Hsp100 family in *Saccharomyces cerevisiae*, cooperates with Hsp70 in protein refolding. *FEBS Lett*, 489 (1): 92~96
- Lee S, Sowa ME, Watanabe YH, Sigler PB, Chiu W, Yoshida M, Tsai FTF (2003). The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. *Cell*, 115 (2): 229~240
- Lee YRJ, Nagao RT, Key JL (1994). A soybean 101-kD heat shock protein complements a yeast HSP104 deletion mutant in acquiring thermotolerance. *Plant Cell*, 6 (12): 1889~1897
- Li J, Sha B (2003). Crystal structure of the *E. coli* Hsp100 ClpB N-terminal domain. *Structure*, 11 (3): 323~328
- Lo JH, Baker TA, Sauer RT (2001). Characterization of the N-terminal repeat domain of *Escherichia coli* ClpA—A class I Clp/HSP100 ATPase. *Protein Sci*, 10 (3): 551~559
- Ogura T, Wilkinson AJ (2001). AAA⁺ superfamily ATPases: common structure—diverse function. *Genes Cells*, 6 (7): 575~597
- Park SK, Kim KI, Woo KM, Seol JH, Tanaka K, Ichihara A, Ha DB, Chung CH (1993). Site-directed mutagenesis of the dual translational initiation sites of the *cipB* gene in *Escherichia coli* and characterization of its gene product. *J Biol Chem*, 268: 20170~20174
- Sanchez Y, Taulien J, Borkovich KA, Lindquist S (1992). Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J*, 11: 2357~2364
- Schirmer EC, Lindquist S, Vierling E (1994). An Arabidopsis heat shock protein complements a thermotolerance defect in yeast. *Plant Cell*, 6 (12): 1899~1909
- Sharon JK, Cynthia MB, Janine GH, Kelly AK, Marisia MJ, Dean LT, Calvin LKJ, Sherry LK (2000). Acquired thermotolerance and expression of the HSP100/ClpB genes of lima bean. *Plant Physiol*, 123: 1121~1132
- Singla SL, Pareek A, Kush AK, Grover A (1998). Distribution patterns of 104 kDa stress-associated protein in rice. *Plant Mol Biol*, 37 (6): 911~919
- Sotelo NJ, Martínez LM, Ponce G, Cassab IG, Alagón A, Meeley BR, Marcel JR, Yang RY (2002). Maize Hsp101 plays important roles in both induced and basal thermotolerance and primary root growth. *Plant Cell*, 14 (7): 1621~1633
- Squires C, Squires CL (1992). The Clp proteins: proteolysis regulators or molecular chaperones? *J Bacteriol*, 174 (4): 1081~1085
- Squires CL, Pedersen S, Ross BM, Squires C (1991). ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. *J Bacteriol*, 173: 4254~4262
- Struba C, Schlieker C, Bukaub B, Mogka A (2003). Poly-L-lysine enhances the protein disaggregation activity of ClpB. *FEBS Lett*, 553 (1~2): 125~130
- Tek V, Zolkiewski M (2002). Stability and interactions of the amino-terminal domain of ClpB from *Escherichia coli*. *Protein Sci*, 11: 1192~1198
- Watanabe YH, Motohashi K, Yoshida M (2002). Roles of the two ATP binding sites of ClpB from *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem*, 277 (8): 5804~5809
- Wells DR, Tanguay RL, Le H, Gallie DR (1998). HSP101 functions as a specific translational regulatory protein whose activity is regulated by nutrient status. *Gene Dev*, 12 (20): 3236~3251
- Zolkiewski M (1999). ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation. A novel multichaperone system from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 274 (40): 28083~28086