

植物热激蛋白70

张侠^{1,2} 尹海波¹ 熊冬金² 张慧¹ 赵彦修^{1,*}

¹ 山东师范大学逆境植物重点实验室, 济南 250014; ² 南昌大学生命科学与食品工程学院, 南昌 330047

The Progress in Heat Shock Protein 70

ZHANG Xia^{1,2}, YIN Hai-Bo¹, XIONG Dong-Jin², ZHANG Hui¹, ZHAO Yan-Xiu^{1,*}

¹ Key Laboratory of Plant Stress Research, Shandong Normal University, Jinan 250014; ² College of Life Science and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047

提要 植物热激蛋白70 (HSP70) 由多基因家族编码。除热胁迫外, 其它环境因素如低温、干旱等也能诱导 *HSP70* 基因的大量表达。HSP70 主要参与新生肽的成熟与分选、变性蛋白的复性或降解等细胞活动。该文介绍 HSP70 的结构、功能和调控的研究现状。

关键词 植物热激蛋白70; 分子伴侣; 热胁迫

生物体遭受热胁迫后, 体内正常蛋白的合成受到抑制, 细胞转向合成一类特殊蛋白, 此种现象最早由 Ritossa^[1] 于1962年在果蝇体内发现, 并将此类蛋白命名为热激蛋白(heat shock proteins, HSPs)。后来研究发现, 这种现象也出现在植物体内。除热胁迫以外, 其它环境胁迫因子如干旱、低温、重金属离子等也会诱导植物体内 HSPs 的大量合成^[2]。

在系统发育中, HSPs 是一类氨基酸序列与功能极为保守的蛋白质。按其相对分子量的大小可分为以下几类: HSP110、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40 和小分子热激蛋白(small HSPs)^[3]。近十几年的研究证明, 大分子 HSPs 在离体和活体条件下都能作为分子伴侣(molecular chaperone)行使功能。目前, 研究较多的是 HSP70 家族, 因此本文对 HSP70 的结构、功能和调控的研究进展作一些介绍。

1 HSP70基因家族的定位

植物 HSP70 由多基因家族编码。拟南芥中存在 14 个 *HSP70* 基因, 其中 12 个编码全长蛋白; 菠菜中至少存在 12 个编码 HSP70 的基因^[4,5]。序列分析表明 *HSP70* 基因家族可分成 4 个主要亚族, 各亚族分别定位于细胞质、内质网、质体和线粒体中。有研究显示, HSP70 也存在于细胞的其它区室如乙醛酸循环体和蛋白体(protein body)中^[6]。植物 HSP70 是高度保守的, 来自不同植物的 HSP70 在氨基酸水平上的同源性高于 75%。植物线粒体和质体 HSP70 与细菌中的 DnaK (HSP70 同

源物) 同源性较高, 而内质网中的 BiP (HSP70 同源物) 与胞质 HSP70 同源性则更高一些^[6]。在植物 HSP70 的 C 端存在一基序(motif), 该基序是 HSP70 各亚族特有的而且高度保守, 例如定位于胞质中的 HSP70 的基序序列为 EEVD, 内质网中的为 HDEL, 线粒体中的为 PEAEYEEAKK, 质体中的为 PECDVLDADFTDSK^[4]。

不同定位的 HSP70 亚族成员在基因结构上也有各自的特点。胞质 *HSP70* 没有或只有 1 个内含子, 定位于各细胞器中的 *HSP70* 却含有多个内含子。更值得注意的是, 线粒体和质体的内含子/外显子结构更为复杂, 其复杂的基因结构可能反映了 *HSP70* 基因从内共生体基因组转移到核基因组这一复杂的进化过程。

2 HSP70s的结构特征

比较所有 HSP70 家族成员的氨基酸序列后发现, HSP70s 包括 2 个主要的功能区(图 1-a): N 端 ATPase 区和 C 端多肽结合区。N 端 ATPase 区约 45 kD, 氨基酸序列高度保守, 具有结合并水解 ATP 的活性; C 端多肽结合区约 25 kD, 通过一绞合链部分与 N 端 ATPase 区连接。在 N 末端还存在一段信号肽, 可引导 HSP70s 定位到不同的细胞器中。C 末端约 100 个氨基酸形成一亚区(C-terminal subdomain), 在 HSP70s 分子伴侣功能

收稿 2003-10-31 修定 2004-02-23

资助 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(G1995011700)。

* 通讯作者(E-mail:zhaoyx@sdu.edu.cn, Tel:0531-6180764)。

中起作用。

三维结构分析表明, 在 HSP70 的 N 端 ATPase 区, ATP 结合位点位于两个主要功能区形成的深沟基部(图 1-b), 结合 ATP 部分的三级结构与己糖激酶的三级结构相似, 表明二者所具有的磷酸转移酶机制及底物诱导的构象改变方式可能相似。多肽结合区存在一个 β -三明治结构亚区(图 1-c)。

C 末端亚区(C-terminal subdomain)形成的 α -螺旋作为一个盖子(lid)结构在多肽结合中起作用。当 ATP 结合到 HSP70 时引起 ATPase 区的构象发生改变并传至多肽结合区, 导致“盖子”打开, 多肽结合到 HSP70 上; 随后 ATP 的水解导致“盖子”关闭, 从而“捕捉”住结合的多肽, 维持 HSP70 与多肽的长时间结合^[7]。

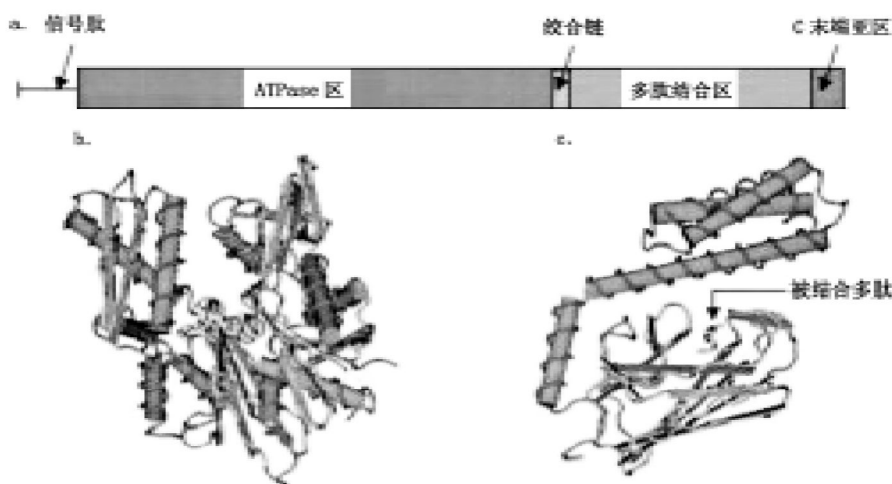


图1 HSP70分子伴侣结构^[8]

a. HSP70 蛋白的结构区域; b. N 端 ATPase 区的三维结构; c. C 端多肽结合区。

3 HSP70的辅蛋白

大肠杆菌 DnaK 有两种辅助蛋白——DnaJ 和 GrpE。DnaJ 可以促进 HSP70 与底物和 ATP 的结合, 加速 HSP70-底物复合体的形成。目前, 已有足够的证据表明 DnaJ 本身可通过 J-结构内的锌指结合硫氰酸酶一类的未折叠蛋白, 防止这些蛋白发生聚集^[9]。Luke 等^[10]推测 DnaJ 还可能决定 HSP70 对底物的选择性, 需折叠或转运的蛋白首先与 DnaJ 结合, 再通过 DnaJ 与 HSP70 发生作用。这可以用于解释为什么 HSP70 本身不具有底物选择性, 却能负责胞内不同蛋白的折叠与组装的原因。DnaJ 可能通过 J-结构区与 DnaK 的 ATP 结合区域的外露通道相互作用, 也能作用于其肽结合区附近区域。分析认为 DnaJ-底物-DnaK (ATP-ADP) 复合物形成是整个结合过程的限速步骤。高等植物中也存在 DnaJ 的同源蛋白, 这些蛋白对线粒体和内质网蛋白的转运是必需的, 而且本身可以受高温和盐胁迫的诱导。GrpE 是原核生物 HSP70 的核苷酸交换因子, 它结合到 DnaK 后可

以打开 DnaK 的核苷酸结合位点, 加速 ADP 的解离, 促进 ATP 的结合与底物的释放^[11]。到目前为止, 植物中尚未发现 GrpE 的同源蛋白。

在真核生物中 Hip 蛋白结合于 HSC70 (heat shock cognate protein) 的 ATP 结合区, 能稳定 HSC70 与 ADP 及底物多肽的结合, 并激活 HSC70 帮助蛋白折叠的活性^[12]。在拟南芥基因组中发现 2 个可能编码 Hip 同源物的序列 (BAB02710 和 CAA16552)。

BAG-1 是 HSC70 的负调控子^[13], 它通过一包含 45 个氨基酸的区域 (BAG 区) 与 HSC70 的 ATPase 区结合。与 GrpE 类似, 它能激活 ATP 的水解, 加速 ADP 的释放。BAG-1 能抑制 HSP70 的分子伴侣活性, 并可作为 Hip 的竞争性拮抗物。拟南芥基因组中至少存在 4 个可能编码 BAG-1 的序列 (BAB11054、CAB87278、BAB10172、ACC14405)。CHIP 存在于细胞质中, 能够与 HSC70 的 C 末端结合^[14], 抑制 HSP40 (DnaJ) 对 HSC70 的 ATPase 活性的激活作用, 作为 HSP70

的负调控子起作用。在拟南芥基因组中只发现1个可能编码CHIP的序列(AAF02162)。

4 HSP70的功能

从功能上看, HSP70家族可分为组成型和热诱导型2种, 它们主要参与新生肽的成熟与分拣(maturing and sorting)以及分泌蛋白向细胞器或胞外的转运等细胞活动, 在胁迫条件下HSP70能防止蛋白降解, 有利于变性蛋白的复性。

目前, 对植物胞质HSP70的功能研究较少, 普遍认为其功能与原核、真核生物HSP70极为相似, 参与诸如蛋白质折叠、变性蛋白复性、防止蛋白降解等细胞活动。体外实验证明胞质HSP70与分泌蛋白的新生多肽存在某种联系, 能使真核细胞蛋白处于一种适合转运的状态。Miernyk等^[15]报道从小麦胚提取物中去除胞质HSP70之后, 前体蛋白的翻译和加工过程即受到抑制; 重新加入胞质HSP70后, 前体蛋白的翻译和加工过程恢复正常。他们推测胞质HSP70在前体蛋白转运至内质网的过程中发挥作用。另外, Sung和Guy^[16]研究发现过量表达*HSC70-1*能提高转基因拟南芥株系的热耐受性, 证明胞质HSP70对提高植物耐逆性有一定作用。

植物内质网BiP蛋白是植物HSP70蛋白家族中研究最多的一类。目前, 在植物中已发现了多种BiP的内源蛋白。Galili等^[17]发现在大量合成贮存蛋白的胚乳中BiP含量很高, 而在其它组织中BiP含量正常, 说明BiP的表达量与蛋白质合成与组装的要求是一致的。Li等^[18]进一步证实水稻BiP可以与仍在核糖体上翻译的谷醇溶蛋白(prolamin)结合。在体外用低浓度的ATP处理, 发现与已形成蛋白颗粒的谷醇溶蛋白结合的BiP发生解离, 但与新生的谷醇溶蛋白结合的BiP却不能发生解离, 这种紧密结合可能是防止了谷醇溶蛋白发生无序聚集之果。当BiP-谷醇溶蛋白复合体达到一定浓度后, 就可以形成蛋白体。这种现象在玉米^[19]和小麦^[20]中都存在。这说明BiP蛋白直接参与正在翻译的蛋白的成熟过程。此外, 在胁迫条件下, BiP能与异常蛋白结合, 防止其降解。也有报道说, 虽然高温胁迫后植物HSP70表达量会显著升高, 但在持续转录酵母*BiP*基因的转基因烟草中, BiP蛋白水平也只提高2倍, 转基因植株的耐热性并没有明显提高^[21]。

线粒体的大多数蛋白是在胞质中合成的, 由

于线粒体内外膜在其自然状态下对蛋白不具有通透性, 因此, 这类蛋白需通过线粒体膜上的通道完成其跨膜转运, 此过程需要分子伴侣的作用以保证转运蛋白处于非折叠(unfolding)状态。目前, 酵母线粒体跨膜转运过程研究得比较清楚。在胞质分子伴侣如HSP70的作用下, 未成熟多肽打开折叠, 借助于线粒体内外膜上的通道蛋白, 穿过线粒体外膜及内膜, 进入线粒体基质内。在线粒体基质中, 原本与ATP相结合的线粒体HSP70(mtHSP70)开放其底物结合区, 结合刚转运进来的未折叠多肽, 在mtHSP70的ATP酶作用下, ATP水解成ADP后这种结合更稳定, 同时, mtHSP70连同它的辅助蛋白如Mge1使未成熟多肽完成正确折叠。完成底物蛋白正确折叠之后, ATP代替ADP结合到mtHSP70上, 准备下一个循环。在植物体内的线粒体蛋白跨膜转运过程也大致如此, 已发现多种参与跨膜转运过程的因子, 如外膜膜蛋白(TOM)、内膜膜蛋白(TIM)。

与线粒体HSP70相似, 高等植物叶绿体膜和基质中的HSP70也在蛋白跨叶绿体膜转运过程中发挥作用, 已证实叶绿体膜上的HSP70同源物Lap70和Com70是转运系统中的成分^[22]。然而, 衣藻中编码叶绿体基质HSP70的*HSP70B*基因的表达不仅受热诱导而且受低光诱导, Schroda等^[23]从中发现了基质HSP70的又一重要功能: 即参与光抑制过程中光系统II(PS II)的光保护和修复。他们的研究表明: *HSP70B*过量表达的衣藻株系对光抑制的抗胁迫能力增强, 受损的PS II修复也更快, 而减量表达(under-expression)*HSP70B*的株系情况却相反。推测其可能机制是过量表达*HSP70B*的株系中受损的PS II活性恢复不再依赖于D1蛋白的从头合成, 而是通过HSP70B与PS II其它反应中心蛋白分子相互作用, 从而有利于PS II受体面(acceptor side)的激活。此外, HSP70B也在PS II新的反应中心装配过程中起作用。HSP70B加快修复过程中必需的叶绿体蛋白的合成, 加速转运某些核编码的多肽进入叶绿体, 使D1的降解和从头合成达到适宜的平衡, 从而大大加速PS II的修复和重新激活。

5 HSP70基因的表达调控

高温是诱导HSP70表达的主要因素。一些研究表明, 大多数植物的HSP70基因在37~45℃下处理30 min~2 h后有强的快速表达^[5, 24]。热诱导

HSP70 的表达是通过热激转录因子(heat shock factors, HSFs)和某些相应的热激元件(heat shock

elements, HSEs)起作用的(图2)。

在正常条件下, 细胞质中 *HSP70* 和 HSF 结合

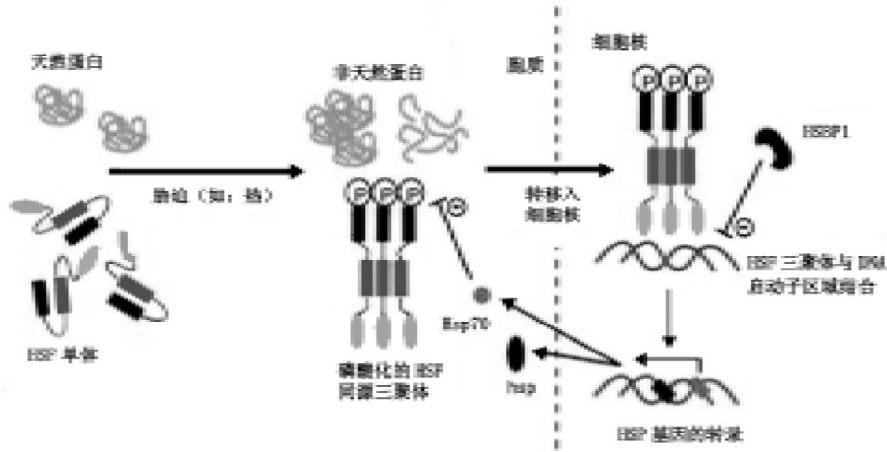


图2 HSF对*HSP*基因转录的调控过程^[25]

形成复合物, 此时 HSF 没有活性。当受到热胁迫或其它环境胁迫后, 大量 *HSP70* 与热变性蛋白结合, 从而使 HSF 从 *HSP70*-HSF 复合物中释放出来, 游离的 HSF 发生磷酸化形成有活性的三聚体并转入核内, 在核内与 HSE 结合, 激活其下游热诱导基因(包括 *HSP70*)的表达。大量诱导合成的 *HSP70* 蛋白可与新合成的 HSF 结合, 抑制其向核内的进一步转运, 从而反馈抑制热激反应。在核内 HSF 的活性也受到 HSBP (heat shock binding protein) 的负调控。这一模型在动物中已得到很好的阐述。Lee^[26]等研究发现拟南芥的热激转录因子 AtHSF1 在正常温度下组成性表达, 但并不具有结合特定 DNA、激活热激蛋白基因转录的活性。当采用基因工程手段使 HSF-GUS (HSF-glucuronidase) 融合基因在拟南芥中过量表达后, HSF 的功能可去抑制, 因而植物体内的 *HSP70* 在正常温度下得以组成性表达。Wunderlich 等^[27]的研究表明, 抑制拟南芥 *HSF1* 的表达可降低 HSPs 的诱导水平, 减少转基因拟南芥的基础热耐受性和获得热耐受性。这一研究结果进一步证明植物体内可能存在类似的调控模型。

其它环境因素如低温^[4, 24]、干旱、高盐等也能诱导 *HSP70* 基因的大量表达。此外, 拟南芥 *HSP70* 家族各成员在种子成熟和萌发期的表达量有明显不同^[5]。如 *BiP-1* 在种子成熟过程中表达量呈下降趋势, 到种子成熟时几乎检测不到它的存

在, 而在种子萌发后的 6~96 h 内表达量迅速上升; 与之相反, *mtHSC70-2* 在种子成熟过程中表达量上升, 在种子萌发后的 6 h 达峰值, 此后, 随种子萌发时间的延长其表达量不断下降。可见, 植物 *HSP70* 的表达还明显受植物发育的调节。

6 展望

近年来, *HSP70* 的研究成为一个热点, 已从不同植物体中克隆获得了 *HSP70* 家族各成员的同源基因。它们的主要功能是作为分子伴侣参与新生肽的成熟以及蛋白质变性后的复性、降解, 维持内环境的稳定^[2]。*HSP70* 的表达不仅受诸如高温、低温^[4, 24]、干旱、高盐等胁迫因素的诱导, 也受植物发育阶段的调控^[5]。因此, 热激蛋白的研究将是提高植物抗高温及其它相关逆境胁迫的重要领域。一些研究证明 *HSP70* 的过量表达确实提高了植物的热耐受性^[16]; 但也有研究表明 *HSP70* 的过量表达没有显著提高植物的热耐受性^[21]。这可能是由于植物体内其它 HSP 和与其相关的生理变化对提高植物热耐受性也起一定作用, *HSP70* 可能与这些因素协同作用促使植物获得热耐受性。因此, 今后还应利用分子生物学新技术和新方法, 如点突变或敲除(knockout)突变, 产生大量拟南芥 *hsp70* 突变株技术, 鉴定和深入研究 *HSP70* 这一基因家族中各成员的功能。

参考文献

- 1 Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 1962, 18:571~573
- 2 Bryan DM, Yacov YL. Heat stress. In: *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants*. Kluwer Academic Publishers, 1994. 181~193
- 3 陈忠, 苏维埃, 汤章城. 植物热激蛋白. *植物生理学通讯*, 2000, 36(4):289~296
- 4 Guy CL, Li QB. The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family. *Plant Cell*, 1998, 10:539~556
- 5 Sung D, Vierling E, Guy C. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis hsp70* gene family. *Plant Physiol*, 2001, 126:789~800
- 6 Wimmer B, Lottspeich F, Van der Kle I et al. The glyoxysomal and plastid molecular chaperones (70-kDa heat shock protein) of watermelon on cotyledons are encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:13624~13629
- 7 Zhu X, Zhao X, Burkholder WF et al. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science*, 1996, 272:1606~1614
- 8 Sung DY, Kaplan F, Guy CL. Plant hsp70 molecular chaperones: Protein structure, gene family, expression and function. *Physiol Plant*, 2001, 113:443~451
- 9 Szabo A, Korszun R, Hartl FU. A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *EMBO J*, 1996, 15:408~417
- 10 Luke MM, Sutton A, Amdt KT. Characterization of SIS1, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of bacterial dnaJ proteins. *J Cell Biol*, 1991, 114:623~638
- 11 Liberek K, Marszalek J, Ang D. The *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate DnaK's ATPase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:2874~2878
- 12 Luders J, Demand J, Schonfelder S et al. Cofactor-induced modulation of the functional specificity of the molecular chaperone Hsc70. *Biol Chem*, 1998, 379:1217~1226
- 13 Shinichi T, Xie Z, Reed JC. An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J Biol Chem*, 1999, 274:781~788
- 14 Ballinger CA, Connell P, Wu Y et al. Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol*, 1999, 19:4535~4545
- 15 Miernyk JA, Duck NB, Shatters Jr RG et al. The 70-kilodalton heat shock cognate can act as a molecular chaperone during the membrane translocation of a plant secretory protein precursor. *Plant Cell*, 1992, 4:821~829
- 16 Sung DY, Guy C. Physiological and molecular assessment of altered expression of *Hsc70-1* in *Arabidopsis*. Evidence for pleiotropic consequences. *Plant Physiol*, 2003, 132:979~987
- 17 Galili G, Shimoni Y, Giorini-Silfen S. Wheat storage proteins: Assembly, transport and deposition in protein bodies. *Plant Physiol Biochem*, 1996, 34:245~252
- 18 Li X, Wu Y, Zhang DZ et al. Rice prolamine protein body biogenesis: a BiP-mediated process. *Science*, 1993, 262:1054~1056
- 19 Galante E, Vitale A, Manocchi L. Genetic control of a membrane component and zein deposition in maize endosperm. *Mol Genet*, 1983, 192:316~321
- 20 Rubin R, Kevanony H, Galili G. Evidence for the presence of two different types of protein bodies in wheat endosperm. *Plant Physiol*, 1992, 99:718~724
- 21 Vitale A, Bielli A, Ceriotti A. The binding protein associates with monomeric phaseolin. *Plant Physiol*, 1995, 107:1411~1418
- 22 Kourtz L, Ko K. The early stage of chloroplast protein import involves Com70. *J Biol Chem*, 1997, 272:2808~2813
- 23 Schroda M, Vallon O, Wollman F-A et al. A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (hsp70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell*, 1999, 11:1165~1178
- 24 Li QB, Haskell DW, Guy CL. Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato. *Plant Mol Boil*, 1999, 39: 21~34
- 25 Pockley AG. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? *Exp Rev Mol Med*, 2001, 21, September, <http://www-ermm. cbcu. cam. ac. uk/01003556h. htm>
- 26 Lee JH, Hubel A, Schöffl F. Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermotolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant J*, 1995, 8(4): 603~12
- 27 Wunderlich M, Werr W, Schöffl F. Generation of dominant-negative effects on the heat shock response in *Arabidopsis thaliana* by transgenic expression of a chimaeric HSF1 protein fusion construct. *Plant J*, 2003, 35:442~451