

特约综述



本实验室主要从事线粒体蛋白质量控制与疾病研究。目前的主要研究方向有: ATP依赖的Lon及ClpXP蛋白酶维护线粒体基因组稳定及控制蛋白质量的分子机制的研究、线粒体蛋白酶与肿瘤发生发展及神经退行性疾病的相关性、以Lon和ClpXP蛋白酶为靶点的相关药物的筛选及肿瘤抑制因子hTid1对于Jak/Stat信号通路的调控机制等。

<http://jsxy.wzmc.edu.cn/show.asp?id=748>

ClpP蛋白酶研究进展: 从细菌到人线粒体

陈林^{1,2#} 蓝林华^{1,2#} 何海栋^{3#} 陈志博³ 余诗琦³ 刘永章^{1,2} 吕斌^{1,2*}

¹温州医科大学生物物理研究所, 温州 325035; ²温州医科大学检验医学与生命科学学院, 温州 325035;

³温州医科大学第二临床医学院, 温州 325035)

摘要 Caseinolytic protease(ClpP)是一种包含丝氨酸蛋白酶催化三联体结构域的ATP依赖的蛋白水解酶, 广泛存在于原核生物以及真核生物的线粒体和叶绿体中。它通常与AAA⁺家族的分子伴侣ClpX结合形成ClpXP蛋白酶复合物, AAA⁺家族成员能利用水解ATP提供的能量将蛋白底物去折叠, 随后将底物分子转移至ClpP蛋白酶的水解腔体进行降解。ClpP蛋白酶对细胞内蛋白质量控制及维持体内稳态起到至关重要的作用。该文综述了近年来有关ClpP蛋白酶在结构、功能以及与细菌毒力的关系和有关药物开发等方面的研究。

关键词 线粒体; ClpP蛋白酶; ClpX; 蛋白质质量控制; AAA⁺分子伴侣

Progress in the Studies of ClpP: from Bacteria to Human Mitochondria

Chen Lin^{1,2#}, Lan Linhua^{1,2#}, He Haidong^{3#}, Chen Zhibo³, She Shiqi³, Liu Yongzhang^{1,2}, Lü Bin^{1,2*}

¹Institute of Biophysics, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China;

²School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China;

³The Second Clinical Medical School, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract Caseinolytic protease (ClpP) is an energy-dependent serine protease. It is highly conserved throughout bacteria to eukaryotic mitochondria and chloroplasts. ClpP is usually in association with AAA⁺ family of

国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2013CB531702)、国家自然科学基金(批准号: 31070710、31171345)、浙江省钱江人才B基金(批准号: 2010R10045)、浙江省自然科学基金(批准号: Y2110097)和浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划, 批准号: 2012R4130005)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0577-86699722, E-mail: lubmito@wmu.edu.cn

This work was supported by the National Key Basic Research Program of China (973 Program) (Grant No.2013CB531702), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31070710, 31171345), Zhejiang Qianjiang Talent Project B Grant (Grant No.2010R10045), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.Y2110097) and the Undergraduate Student Science & Technology Innovation Research Program of Zhejiang Province (Xinmiao Talent Project, Grant No.2012R4130005)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-577-86699722, E-mail: lubmito@wmu.edu.cn

网络出版时间: 2014-06-05 15:42 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.06.9002.html>

molecular chaperone to form ClpXP complex. The members of this family use the energy of ATP hydrolysis to unfold protein substrates and translocate them through a central pore and into the degradation chamber of ClpP. They play a vital role in the protein quality control within mitochondrial matrix and the maintenance protein homeostasis. Here, we reviewed recent studies on the structures and functions of ClpP, as well as the bacterial virulence. We also summarized the studies of ClpP as a drug target for novel antibiotics, the potential target as an anti-cancer and treatment of neurodegenerative diseases.

Key words mitochondria; ClpP; ClpX; protein quality control; AAA⁺ chaperones

AAA⁺家族蛋白(ATPases associated with diverse cellular activities, 与多种细胞活性相关的ATP酶)通过利用ATP产生的能量与底物蛋白分子结合, 并进一步水解底物分子, 这对于维持机体的正常代谢和适应各种应激反应起着重要的作用。该家族成员包括Clp复合物家族(ClpXP、ClpAP、ClpCP和HslUV等)、FtsH、PAN/20S、Lon和26S蛋白酶体等。其中, Clp复合物家族在物种进化过程中是高度保守的, 从细菌基质到人类线粒体中都能检测到该蛋白酶的同源类似物。该复合物主要由两部分构成, 即由ClpP蛋白酶亚基和Clp ATP酶亚基构成。ClpP蛋白酶是细胞内一种重要的热休克蛋白(heat-shock protein), 在体内主要发挥蛋白水解酶作用, 降解异常蛋白或短寿期蛋白。ClpP作为蛋白酶亚基常与ATP酶亚基(ClpA/ClpX等)结合成Clp复合物, 共同行使蛋白酶的功能。Clp复合物是由两个堆积的同质寡聚ClpP七聚体环面对面堆积而成, 六聚体环的Clp ATP酶分子伴侣聚合在该十四聚体的一端或两端组合为Clp全酶复合体。作为一种重要的蛋白水解酶, ClpP参与蛋白高级结构的正确折叠, 降解体内受到损伤的蛋白, 对维持机体代谢平衡具有重要的意义。

1 ClpP蛋白酶的发现

目前对ClpP蛋白酶的研究主要集中于细菌。ClpP基因首次发现于大肠杆菌中^[1], 该基因编码207个氨基酸的ClpP蛋白分子, 在自我剪切掉N-端的14个氨基酸后成为21.5 kDa的成熟ClpP蛋白酶。在机体内, 只有成熟的ClpP才能发挥蛋白酶的作用^[2]。ClpP虽然具有丝氨酸活性位点, 但单独存在的ClpP蛋白酶仅能降解小于5个氨基酸的多肽分子, 该蛋白在降解全长的去折叠的蛋白(如 α -casein)时效率很低。ClpP蛋白能与ClpA或ClpX等ATP酶结合为Clp复合物, 复合物的形成能更为有效地降解复杂的多肽和折叠的蛋白。

在大肠杆菌体内, ClpP和AAA⁺分子伴侣构成Clp复合物, 如ClpXP和ClpAP。AAA⁺蛋白同时也属于HSP/Clp分子伴侣家族的成员^[3], 该家族成员能利用水解ATP提供的能量将底物蛋白去折叠, 并把去折叠的多肽转移到ClpP蛋白的活性催化位点, 随后将底物蛋白降解为小片段而释放出来^[4]。

Clp蛋白酶全酶复合物组装的具体过程为: 首先由两个同质七聚体环ClpP组成核心分子, 然后在该核心分子的两极可自由结合一个或两个同质六聚体Clp ATP酶分子, 这样就构成了具有完整活性的Clp蛋白复合物。ClpA分子大小为83 kDa, 带有两个AAA⁺结构域。ClpX分子大小为46 kDa, 它仅携带一个AAA⁺结构域。ClpA/ClpX作为分子伴侣能特异性地识别底物并将其去折叠, 去折叠的多肽被运输到ClpP蛋白中心水解腔进行水解。有趣的是, 蛋白的去折叠和将去折叠的多肽转移通过分子伴侣需要ATP水解提供能量, 而水解去折叠的多肽则不需要ATP水解供能。ClpA/ClpX等分子伴侣的结合和去折叠机制目前不是十分清楚, 在细菌中还发现有其他的ClpA同源类似物, 包括ClpC、ClpL和ClpE等^[5]。

在大肠杆菌中, ClpA与ClpP的亲合能力是ClpX与ClpP的2倍, 同质ClpA六聚体环和同质ClpP十四聚体环的最佳结合比例是2:1^[6], ClpAP可以非特异地降解蛋白底物为7~10个氨基酸残基的产物, 该过程需要ATP水解供能和Mg²⁺的参与^[7]。ATP能结合在ClpA蛋白的两个不同的结构域, 结合在其中一个结构域时可为ClpAP降解底物提供能量, 当与另外一个结构域结合时则会引起ClpA的寡聚化^[8]。大肠杆菌ClpXP/ClpAP复合物广泛识别的底物是带有a small stable RNA(ssrA) C-端标签的蛋白。ClpAP复合物的另一个底物是MazE, 它是参与大肠杆菌细胞程序性死亡的一种蛋白^[9]。此外, Clp复合物的形成较二者单独存在时有一些功能上的变化。比如, 在解聚生物大分子时, ClpXP比单独的ClpX具有更

强的活力, ClpX能激活ClpP的肽酶活力, ClpP抑制ClpX的ATP酶活力。这表明, ClpX和ClpP之间的相互作用与ClpP蛋白酶的活性及ClpP对底物的降解速率密切相关^[10]。

2 ClpP蛋白酶的结构与功能

ClpP通常与分子伴侣(如ClpA、ClpE、ClpX和ClpC等)组合成为Clp复合物, 共同行使蛋白酶的功能。Clp蛋白酶复合物是一种桶状的异质寡聚体结构。图1所示是有关ClpP结构和功能的示意图, 从图中可以看到: ClpP十四聚体是一个轴向的桶装结构, 椭圆形分子伴侣(Clpx等)可以结合在ClpP十四聚体的两端。在分子伴侣捕获到目的蛋白后, 利用水解ATP提供能量将底物蛋白去折叠, 然后通过顶端轴向孔转移至ClpP的水解大腔体, 此时去折叠的多肽就能被ClpP水解为小的肽段, 接着十四聚体ClpP蛋白分子发生结构上的变化, 打开侧面的赤道孔(equatorial side pores)释放出目的蛋白的水解产物。

Clp复合物的两个亚基单独存在时也能发挥部分功能。ClpP是肽酶活性亚基, 它的高级结构是中空的两个同质七聚体环面对面堆积构成的十四聚体, 中间形成一个具有蛋白水解活性位点的大腔体。同质ClpP蛋白酶的十四聚体的每一个亚单位都有一个水解活性位点, 每个水解活性位点都含有相连的三个残基(ser/his/Asp), 称为催化三联体氨基酸。因

此, 同质ClpP蛋白酶十四聚体在它们的水解大腔体中共含有14个蛋白水解活性位点^[11]。蛋白底物在大腔体中被降解为5~10个氨基酸残基的产物, 随后ClpP十四聚体指环发生构象的改变释放出水解的蛋白产物^[12]。

ClpX是Clp复合物的ATP酶活性亚基, 它包含三个重要结构域: 一个参与底物识别的家族特异地N-端功能结构域、AAA⁺功能结构域以及一个C-端功能结构域^[13]。ATP酶作为一种功能性的去折叠蛋白酶主要有两个功能, 一是参与蛋白底物的识别, 它能识别特殊标签的蛋白, 如大肠杆菌的C-端11个氨基酸残基的ssrA蛋白; 二是水解ATP提供能量将大分子底物蛋白的高级结构展开, 并把展开后的多肽输送至ClpP蛋白酶的水解腔^[14]。ATP能量依赖蛋白降解的中介步骤是底物的去折叠。通过发挥ClpX分子伴侣功能识别具有特异性标签的底物, 这就直接决定了Clp复合物降解的底物分子。此外, ClpX同时还能参与异常蛋白分子的结构重塑。

ClpP和Clp ATP酶结合成Clp复合物后, 才能更为有效地发挥其降解蛋白底物的功能。Clp ATP酶水解ATP为蛋白底物分子的去折叠提供能量, 同时将去折叠的底物运输通过ClpP狭窄的轴向小孔, 最终到达催化水解的大腔体。ClpP轴向孔的开放经由一个门控机制的调节, 由于N-端结构域位于同质十四聚体靠近轴向孔的边缘位置, 最初认为该门控

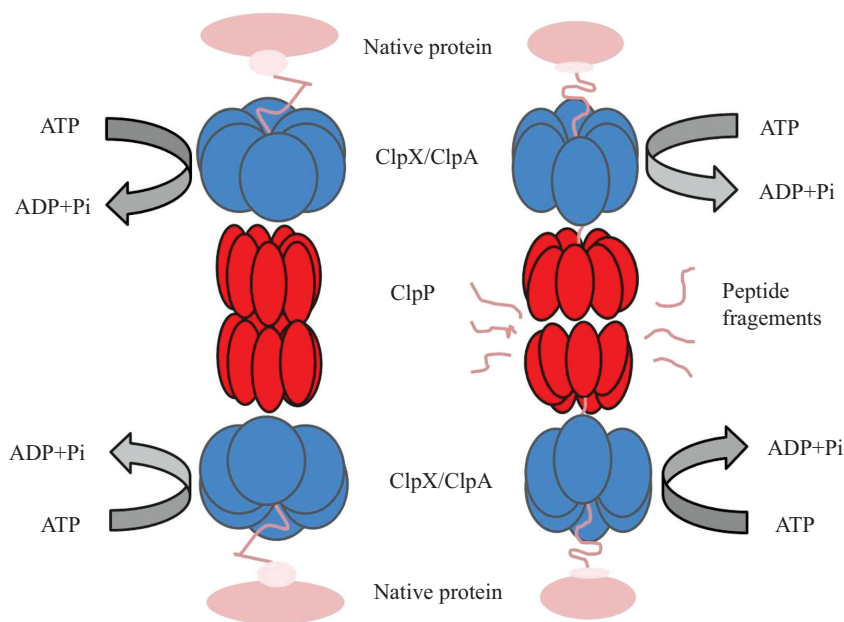


图1 ClpP蛋白酶的结构及其功能(根据参考文献[12]修改)

Fig.1 The structure and function of ClpP (modified from reference [12])

机制的调节由ClpP蛋白酶N-端结构域控制。研究表明, 缺失N-端前段的10~17个氨基酸后, ClpP能够快速降解去折叠的大分子底物, 该降解不依赖于分子伴侣ClpA和ClpX的辅助^[15]。

因此, 在没有ClpP ATP酶存在的情况下, ClpP的N-端区域必须维持闭合的状态以有效地阻止蛋白底物进入水解消化腔。当结合上ClpA或ClpX等分子伴侣后, 进入ClpP水解腔体的蛋白分子主要由分子伴侣来决定。Clp分子伴侣能诱导N-端处理区的构象的打开, 有利于大分子去折叠蛋白底物的转移。有研究发现, 在ClpA、ClpX等分子结合到ClpP之后能诱导十四聚体轴向孔开放, 允许大分子底物进入水解消化腔^[11,16]。研究人员从生物化学的角度发现, ClpP蛋白酶N-端区域的带电残基(Glu8、Arg12、Glu14和Arg15)之间的相互作用对ClpP闭合构型的稳定十分重要。另外, 相邻的两个ClpP七聚体蛋白分子之间形成的疏水簇也能自我稳定该十四聚体的构型^[17]。ClpP蛋白酶分子间的相互作用力共同控制着ClpP轴向孔的开关。然而, 目前所观测到的X射线下ClpP蛋白酶N-端结构域是高度可变的, 所以ClpP蛋白酶N-端结构域的构型的变化与轴向孔开合之间的关系仍难以明确。目前, 关于底物具体是如何被降解以及降解产物是通过怎样的途径来释放还存在争议, ClpP调节蛋白残基释放的机制还有待进一步的研究。

迄今为止, 许多物种ClpP的晶体结构已经明确, 除了人类hClpP以外, 还包括大肠杆菌、肺炎链球菌、恶性疟原虫和结核分支杆菌^[18]。比对这些物种中ClpP的基因序列, 发现它们高度相似, 这为我们进一步了解该蛋白的功能和作用机制提供了理论基础。

3 ClpP蛋白酶与微生物的关系

自从大肠杆菌中的ClpP被发现以后, 随着对该蛋白酶的相关研究不断深入, 包括ClpP生化结构信息、蛋白质相互作用以及晶体结构的研究都取得了极大的进展。整体来看, 国内外对于ClpP蛋白酶的研究主要集中在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、结合杆菌等原核生物中。随着对ClpP蛋白酶研究的逐渐深入, 发现它在生物体内发挥的重要性可能超乎我们的想象。迄今已发现ClpP与许多细菌的活力相关, 包括在芽孢的形成、细胞生存、应激耐受性和基因表达及调控等方面都起到了至关重要的作用。

ATP依赖的蛋白酶能选择性地降解细胞内的蛋白, 对细胞蛋白进行精确的质量控制, 参与影响细胞代谢进程中的许多重要步骤。真核生物中主要的能量依赖的蛋白酶是26S蛋白酶体, 而细菌中26S蛋白酶体的功能则由ClpP家族成员(包括ClpAP、ClpCP、ClpXP和ClpEP等)和Lon蛋白酶及FtsH蛋白酶取代。ClpP是细菌中最广泛表达的能量依赖的蛋白酶^[14]。针对细菌的高通量研究, 已经发现了超过100种ClpXP的底物, 其中许多蛋白分子与细胞应激反应相关^[19-21]。在细菌正常生长过程中, ClpP一般呈低水平表达, 环境条件的变化可刺激ClpP的高水平表达。另一方面, 几乎所有细菌中都有ClpP ATP蛋白酶分子, 其中ClpA和ClpC是直系同源的。ClpA发现于革兰氏阴性菌的变形门细菌中, 而ClpC发现于革兰氏阳性细菌和蓝藻中^[12]。

3.1 ClpP与枯草芽孢杆菌

ClpP蛋白酶在维持压力条件下细胞的的耐受性和生存至关重要。热激条件下, 枯草芽孢杆菌中的ClpP的合成会增加。此外, 在高盐浓度刺激、氧化压力应激以及糖源和供氧缺乏时也会诱导ClpP表达水平的升高。乙醇和嘌呤毒素的刺激也能迫使ClpP表达水平上升^[22]。

研究发现, 枯草芽孢杆菌(革兰氏阳性细菌)中ClpC/ClpP/ClpX的缺失或突变会导致表型的多样性, ClpP的突变体在压力条件下不能正常生长, ClpP蛋白酶缺失的细菌在高温条件下生长受到明显阻碍。枯草芽孢杆菌ClpX具有分子伴侣的作用, 它能避免热激条件下大分子蛋白的聚集^[23]。在研究枯草芽孢杆菌的ClpP的突变株时发现, 该菌株在新鲜的培养基过夜培养后表现出生长延迟的现象, 在低盐浓度的葡萄糖培养基中生长缓慢甚至停止生长。在LB或形成孢子的琼脂培养基中培养约48 h后, ClpP缺失的突变株会出现自我裂解, 同时其形态高度地纤维化, 在指数生长期变得很细长^[24]。

除了压力应激, ClpP还参与不同菌类的多个发生过程。枯草芽孢杆菌中ClpP参与另外一个重要的生长过程: 孢子的形成。缺乏ClpP时, 孢子形成的关键蛋白spoll和spollG基因表达几乎全部被抑制, 此时, 枯草芽孢杆菌不能产生孢子^[25]。ClpP基因的缺失会抑制comK基因(一种感受态转录因子)的表达, 最终影响到细胞DNA的转化^[26]。

此外, 研究表明枯草芽孢杆菌ClpP蛋白酶通过

参与降解错误折叠的蛋白或短寿期蛋白, 避免产生蛋白聚集体, 维持了细胞的正常分裂, 也保持了遗传的稳定性。

3.2 ClpP与肺炎链球菌

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, *S.pn*)是一种常见的革兰氏阳性致病菌, 它是社区获得性肺炎、病血症和脑膜炎的最重要的致病源^[26]。许多研究显示, ClpP蛋白酶对肺炎链球菌毒力因子的表达、在宿主体内存活以及从呼吸道转移至宿主组织中帮助其适应新环境发挥了重要作用。

在肺炎链球菌侵入宿主时必须及时地适应宿主环境条件的改变, 包括温度的改变和营养的减少, 此时诱导细菌热休克蛋白(HSPs)的表达, 其中Hsp100/Clp家族的成员在原核生物中广泛表达。该家族成员(Cl pA、Cl pB、Cl pC、Cl pE和Cl pL等)能和含有丝氨酸活性位点的ClpP蛋白酶组成复合物。有报道称, ClpP缺失或突变的肺炎链球菌中, 应激蛋白的表达、核酸代谢、蛋白质代谢及能量代谢都会受到影响。在肺炎链球菌中ClpP(A153P)的突变导致ClpP功能的紊乱, 与野生型相比, 该蛋白水解区域的E螺旋增加了两个弯曲从而使其变得更短, 但是该突变并不引起同质ClpP十四聚体结构的改变, 表明ClpP水解区有一定的可塑性。类似现象也在恶性疟原虫和结核分支杆菌中有发现^[27], 由此推测该区域具有高度的移动性, E螺旋的运动很可能参与水解底物从ClpP赤道孔的释放。

研究发现, 剧毒的肺炎链球菌株与非毒性的菌株相比, 前者的ClpP表达水平更高^[28]。鼻腔感染实验证实, ClpP突变株较野生型的肺炎链球菌在感染肺部后的生存能力下降, ClpP突变的肺炎链球菌株因为失去了降解异常蛋白的能力而不能正常感染宿主。另外, 有研究显示, ClpP突变株对NO敏感, 而抑制宿主NO的合成则会降低肺炎链球菌株的敏感性, 故此推测, ClpP对氧化应激的敏感可能是通过NO介导的^[29]。

ClpP蛋白酶活力不仅对肺炎链球菌的生理功能有极其重要的作用, 而且对它的毒力也是不可或缺的。在感染的过程中, 肺炎链球菌要克服许多应激条件, 包括温度变化、pH变化、接触宿主产生的活性氧以及营养的缺乏^[30]。ClpP蛋白酶是细菌在压力条件下生长所必需的, 有实验证实, ClpP突变的肺炎链球菌对高温、H₂O₂、以及抗生素等高度敏感^[26],

ClpP蛋白酶可以降解由于长期化疗或使用抗生素导致的体内异常或受到损伤的蛋白。

3.3 ClpP与其他微生物

自从ClpP在原核生物中被发现以来, ClpP在细菌中起到的重要作用和多重角色也越来越多地被揭示。有研究发现, 乳球菌属在热激和pH改变时能诱导ClpP的表达增加。此外, 对比大肠杆菌中的ClpP, 在乳球菌属中插入ClpP的抑制基因会导致细胞活力下降, 表明ClpP在基础代谢中具有重要的作用^[31]。类似的现象也发生在枯草芽孢杆菌中, 当该菌缺失ClpP时会导致形态和生理特征的改变, 表现为丝状纤维的聚集和运动能力丧失^[24]。

在土壤丝状细菌天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)菌丝的形成过程中, ClpP蛋白酶对菌丝体的分化起到重要的作用^[32]。ClpP还参与假单胞菌属生物膜的形成。在茎球菌属中, ClpXP蛋白酶对该菌的生存能力以及细胞周期的调控都有重要影响^[33]。

在单核细胞增生性李斯特菌中, ClpC是其在宿主体内正常生长和生存的一种重要应激蛋白, 感染过程促使细菌从巨噬细胞的噬菌体中释放出来, 从而增加该致病菌的感染能力^[34]。该菌ClpP蛋白酶的缺失使得细菌在高温下的生长受到阻碍。

热激蛋白ClpX具有分子伴侣的特性, 它能够避免大分子蛋白的聚集, 分解聚集的大分子蛋白聚集体^[32]。ClpX对于金黄色葡萄球菌在压力应激下的生长非常重要, ClpX蛋白能够帮助细菌抵抗宿主巨噬细胞所产生的氧化压力, ClpX突变的菌株在小鼠体内的毒力明显减弱^[35]。ClpP对许多其他细菌的毒力也有着重要的作用。研究发现, 其他的Clp蛋白酶, 如ClpC和ClpE也与毒力相关。

ClpX是肺炎链球菌R6菌株生长所必需, 缺失ClpX的该细菌不能生长^[36]。表皮葡萄球菌的ClpP突变株其生物膜形成减少, 此突变株对小鼠模型的感染能力减弱, 这表明ClpP蛋白酶对于细菌生物膜的形成以及细菌毒力都是非常重要的。Lemos等^[37]推测, ClpP可能控制与生物膜形成相关的调节因子的稳定性和活力。

3.4 ClpP在药物开发领域的研究

近年来, 抗生素耐药性细菌不断涌现并广泛传播, 对人类的健康带来极大的威胁。所以, 寻找一种新型的耐药菌作用靶点, 对于开发有效的抑菌药物具有十分重要的意义。

最近,科学家发现了一种新的抗菌复合物Acyldepsipeptides(ADEPs)^[38]。ADEPs作用的特异性位点是ClpP,该蛋白酶通常与HSP100分子伴侣家族成员组成蛋白酶复合物,在体内选择性地降解蛋白底物。通过分析研究ADEPs的分子机制,发现它能阻止ClpP和HSP100分子伴侣的腺苷三磷酸酶结合,使得ClpP蛋白酶从仅能降解短肽分子转换为具有能识别和降解去折叠的多肽的活力,这是一种全新的抗生素机制。

ClpP蛋白酶能参与细胞分裂及细胞分化过程,同时也能影响菌体孢子的形成和毒性因子的表达。所以,ClpP蛋白酶正常发挥其高度的特异性和严密的调控机制对菌体的生存有着十分重要的意义。ADEPs与ClpP的作用首先发现于枯草芽孢杆菌,体外实验发现,在没有HSP100蛋白协同下,ClpP蛋白酶仅具有肽酶活力,而结合ADEPs后,ClpP转换为具有较高的蛋白酶活力,能够降解去折叠状态下的多肽casein。研究证实,ADEPs能引发ClpP蛋白酶复合物结构的重塑,即重排ClpP蛋白酶的核心结构,使该蛋白脱离正常机制的调控,导致细菌代谢功能的紊乱^[39]。综合来看,ADEPs家族是一种显著的抗菌药物,对革兰氏阳性菌以及多重耐药的金黄色葡萄球菌等都有很好的抑制作用。

ADEPs会结合在ClpP七聚体单体的表面,促进ClpP蛋白酶核心的寡聚化,阻断Clp ATP酶与ClpP蛋白酶之间的结合,改变ClpP蛋白酶分子的正常构象,门控通道变大,从而使得某些特殊的蛋白被过早地降解^[40]。ADEPs引起的ClpP正常构象的改变足以使去折叠的蛋白小分子通过,该状态下的ClpP能降解折叠状态下的casein和翻译早期的蛋白多肽链^[41]。

ADEPs能干扰细菌ClpP蛋白酶的活力,抑制细胞的分裂并最终导致细胞死亡。革兰氏阳性细菌的分裂是由一种叫分离体的大分子执行的。分离体具有高度的活力,能时间依赖地组装分裂进程中的一些重要蛋白^[42],分裂体的形成是在GTP驱动的FtsZ的聚合作用下驱动的。FtsZ蛋白在细菌的分裂过程中起着重要作用,能够在分裂位点形成一个环状结构而控制细菌的分裂进程,细胞内FtsZ蛋白浓度的明显降低或异常升高均可阻断正常的细胞分裂过程。ADEPs可以通过激活ClpP蛋白酶活力来降解FtsZ,从而阻止细胞分裂的发生。同时,ADEPs-ClpP也能降解FtsZ的结构类似物,阻断菌体分裂的发生。

另一方面,革兰氏阴性细菌对ADEPs不敏感,因为它们有特殊的排流泵,能将药物从细胞中移除而得以存活,但是通过使用强渗透性的药物有效地阻断细菌的排流泵,也能使ADEPs对革兰氏阴性细菌起到一定的杀菌作用^[39]。

ADEPs独特的分子机制使它成为一种潜在的药物,与以往发现的抗生素最主要的区别在于作用位点:普通的抗生素主要通过DNA、RNA、蛋白质以及细胞壁的生物合成途径相互作用,而ADEPs则通过与ClpP蛋白酶作用,并调节该蛋白酶的活性,对细菌的增殖起到抑制作用。ADEPs通过改变ClpP蛋白酶的构型增加ClpP的活力,同时通过增加ClpP蛋白酶底物的多样性,从而达到抑制细菌生存和分化的目的。Kirstein等^[39]发现,ADEPs可以促进纯化的大肠杆菌ClpP/MerA/ClpA复合物的解离,同时将ClpP蛋白酶转变为一种非ATP依赖的蛋白酶。Lee等^[40]在枯草芽孢杆菌ClpP中研究发现,结合ADEPs以后ClpP蛋白酶N-端loop区的移动性增加,因此,他们认为正是由于该区移动性的增加会造成ClpP轴向孔的开放,这有利于大分子蛋白的通过。另一方面,通过对大肠杆菌ClpP和ADEP复合物的晶体结构研究发现,ADEPs结合到ClpP后,可绕过对ATP酶的依赖,将ClpP蛋白酶的N-端loop区锁定成一个发夹结构,形成一个20 Å的轴向孔,这一改变足以允许去折叠的蛋白底物进入水解腔^[43]。

4 人线粒体基质hClpP的研究

虽然目前大多数关于ClpP蛋白酶的研究主要集中在微生物,但在真核生物中的研究也日益增多。线粒体是真核生物的能量代谢的中心,拥有自身特有的蛋白水解系统。hClpP蛋白酶作为人线粒体重要的蛋白酶之一,在线粒体蛋白质质量控制和线粒体内的应激反应中起着非常重要的作用。

*hClpP*基因定位于19号染色体,该基因编码277个氨基酸的前体蛋白,去掉N-端56个氨基酸后即成为成熟的蛋白,hClpP蛋白酶定位于线粒体基质^[44]。线粒体作为真核生物重要的能量代谢中心,其代谢异常与衰老、神经退行性疾病、癌症的发生相关。线粒体拥有双层膜结构,作为一个半自主的细胞器它拥有完整而独特的蛋白质质量控制系统。hClpP、Lon和m-AAA是真核生物线粒体基质中最重要的三种ATP依赖的蛋白酶,由于不同蛋白酶所识别的底

物存在差异, 所以hClpP在线粒体蛋白质量控制方面又有其不可替代的地位^[45]。hClpP的mRNA在肌肉中高度表达, 在心脏、胰腺和肝脏中表达量稍低, 在大脑、肺部和肾脏中含量很低^[46]。hClpP同源体在几乎所有的物种中都高度保守, 从细菌到原核生物, 仅在古生菌和真菌中缺乏表达^[47]。成熟的人ClpP和大肠杆菌的ClpP的蛋白序列仅存在44%的氨基酸序列一致性^[48]。

特殊的是, hClpP的C-端比大肠杆菌的ClpP要多出28个氨基酸残基, 该多出的C-端能影响hClpP七聚体的聚集, 缺少该C-端的hClpP蛋白酶会形成不稳定地结构。然而, 该片段的缺失能增加hClpP和hClpX的亲合力, 故推测此片段能阻碍hClpP和hClpX的相互作用^[49]。尽管该片段的功能并不十分清楚, 但是这个特殊结构似乎是哺乳动物ClpP所特有的^[50]。

hClpX是人体中唯一一种hClpP的分子伴侣, 由第15号染色体编码。hClpX ATP酶和hClpP蛋白酶的亚基彼此之间产生变构效应组成hClpXP全酶, hClpP能稳定hClpX六聚体结构。在生理条件下, hClpP以单个的七聚体存在, 而大肠杆菌的ClpP则是由两个七聚体环作为一个十四聚体的整体而存在。单环状的hClpP催化三联体是暴露在环境中的, 而大肠杆菌的催化三联体是位于两个七聚体环的中间。另一方面, hClpP仅有有限的肽酶活力, 而大肠杆菌的ClpP则有较高的肽酶活性^[51]。

有趣的是, hClpP和大肠杆菌的ClpX能在体外形成复合物^[52], 在电镜观察下该异源复合体与大肠杆菌体内的ClpXP非常相似, 然而hClpX却无法在体外结合大肠杆菌的ClpP, 大肠杆菌的ClpA ATP酶与hClpP也没有亲和力。研究表明, hClpXP和大肠杆菌的ClpXP所识别的底物是不一样的, 当hClpP结合上大肠杆菌的ClpX之后, 该异源复合体能降解大肠杆菌ClpXP识别的底物。在体外实验中, 虽然hClpXP和大肠杆菌中该酶在底物的选择上有一定的特异性, 但其结构和酶活力都极其相似^[48]。这些研究成果充分表明, 复合物对底物的识别主要取决于ClpP的分子伴侣对底物的识别能力。

hClpP仅有很低的肽酶活力, 当有ATP存在时, 堆积的两个七聚体环hClpP的轴向的两端分别结合上一个hClpX六聚体环形成hClpXP蛋白酶复合体。hClpP与hClpX结合后, hClpP的构象受到影响, 使得hClpXP蛋白酶复合体具有了蛋白酶活力和更强的

肽酶活性。位于hClpP两环接触部位手臂区半胱氨酸残基的突变会影响十四聚体的稳定, 可能会使该十四聚体随机地还原为两个七聚体。在缓冲液中, 纯化hClpP的聚合为七聚体环是瞬时的、极不稳定的, 此时需要hClpX发挥别构效应维持hClpP十四聚体构象的稳定。hClpP和hClpX是线粒体基质中重要的多功能蛋白酶, 除了调控ATP依赖的蛋白底物降解之外, 还有分子伴侣的功能, 参与线粒体蛋白的跨膜转运及蛋白的折叠和去折叠等^[51]。

Perrault综合征患者是一种常染色体异质性疾病, 患者常伴有听力丧失以及卵巢功能衰竭。研究发现, 该疾病可能与线粒体中的ClpP基因的隐性突变有关^[53]。另有研究发现, 在ClpP蛋白酶缺失的基因敲除小鼠中, 线粒体基质中的另一个分子伴侣ClpX表达量增加, 此外, mtDNA以及各种炎症相关因子在线粒体内大量聚集。该基因敲除小鼠表现出听力障碍, 繁育能力均完全丧失, 其运动能力和呼吸能力也有所下降, 生长变得迟缓。然而有趣的是, ClpP敲除的小鼠表现出对溃疡性皮炎的抵抗性, 同时也发现, 该小鼠脾脏中T淋巴细胞被激活^[54]。

最新研究发现, hClpP蛋白酶与肿瘤的发生和发展有密切关系, 例如, 胃腺癌病人癌组织中hClpP蛋白表达水平较正常组织下降。相反, 在急性髓细胞性白血病AML细胞中hClpP蛋白表达水平比正常的造血细胞要高。因此, 确定hClpXP蛋白酶的作用机制, 可以为延缓衰老或改善神经退行性疾病、治疗恶性肿瘤及改善癌症患者预后提供新的理论依据^[55]。

5 展望

目前, 国内外对ClpP蛋白酶的研究依然很少, 大多主要是集中在大肠杆菌、链球菌、分支杆菌和枯草芽孢杆菌中。ClpP作为一种重要的多功能蛋白酶, 对细菌的毒力、氧化应激都起到不可或缺的调控作用, 包括降解错误折叠和受损伤的蛋白分子、阻止大分子蛋白的聚集以及影响RNA聚合酶全酶的组装等。ClpP与高等生物的生育能力、运动能力、听力等都有密切关系。在药物开发方面, 新发现了ADEPs类药物以ClpP为靶标, 可以竞争性地抑制ClpP的活性, 为临床研究提供了理论和分子机制的支持。但是, 对于ClpP在真核生物线粒体中的功能和作用还缺乏了解, 因此, 深入了解ClpP的结构和代谢动力学是很有必要的。通过对该酶的激活剂和抑

制剂的筛选, 利用这些激活剂和抑制剂来控制ClpP蛋白酶的活性, 可以为治疗各种细菌感染相关疾病以及线粒体蛋白异常导致的不孕不育、衰老、肿瘤和神经退行性疾病带来新的希望。

参考文献 (References)

- 1 Katayama-Fujimura Y, Gottesman S, Maurizi MR. A multiple-component, ATP-dependent protease from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1987; 262(10): 4477-85.
- 2 Maurizi MR, Clark WP, Katayama Y, Rudikoff S, Pumphrey J, Bowers B, *et al*. Sequence and structure of ClpP, the proteolytic component of the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1990; 265(21): 12536-45.
- 3 Schirmer EC, Glover JR, Singer MA, Lindquist S. HSP100/Clp proteins: A common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci* 1996; 21(8): 289-96.
- 4 Hoskins JR, Pak M, Maurizi MR, Wickner S. The role of the ClpA chaperone in proteolysis by ClpAP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(21): 12135-40.
- 5 Butler SM, Festa RA, Pearce MJ, Darwin KH. Self-compartmentalized bacterial proteases and pathogenesis. *Mol Microbiol* 2006; 60(3): 553-62.
- 6 Maurizi MR, Singh SK, Thompson MW, Kessel M, Ginsburg A. Molecular properties of ClpAP protease of *Escherichia coli*: ATP-dependent association of ClpA and ClpP. *Biochemistry* 1998; 37(21): 7778-86.
- 7 Thompson MW, Singh SK, Maurizi MR. Processive degradation of proteins by the ATP-dependent Clp protease from *Escherichia coli*. Requirement for the multiple array of active sites in ClpP but not ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 1994; 269(27): 18209-15.
- 8 Singh SK, Maurizi MR. Mutational analysis demonstrates different functional roles for the two ATP-binding sites in ClpAP protease from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1994; 269(47): 29537-45.
- 9 Aizenman E, Engelberg-Kulka H, Glaser G. An *Escherichia coli* chromosomal "addiction module" regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: A model for programmed bacterial cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(12): 6059-63.
- 10 Kim YI, Levchenko I, Fraczkowska K, Woodruff RV, Sauer RT, Baker TA. Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nat Struct Biol* 2001; 8(3): 230-3.
- 11 Gribun A, Kimber MS, Ching R, Sprangers R, Fiebig KM, Houry WA. The ClpP double ring tetradecameric protease exhibits plastic ring-ring interactions, and the N termini of its subunits form flexible loops that are essential for ClpXP and ClpAP complex formation. *J Biol Chem* 2005; 280(16): 16185-96.
- 12 Yu AY, Houry WA. ClpP: A distinctive family of cylindrical energy-dependent serine proteases. *FEBS Lett* 2007; 581(19): 3749-57.
- 13 Singh SK, Rozycki J, Ortega J, Ishikawa T, Lo J, Steven AC, *et al*. Functional domains of the ClpA and ClpX molecular chaperones identified by limited proteolysis and deletion analysis. *J Biol Chem* 2001; 276(31): 29420-9.
- 14 Kress W, Maglica Z, Weber-Ban E. Clp chaperone-proteases: Structure and function. *Res Microbiol* 2009; 160(9): 618-28.
- 15 Jennings LD, Bohon J, Chance MR, Licht S. The ClpP N-terminus coordinates substrate access with protease active site reactivity. *Biochemistry* 2008; 47(42): 11031-40.
- 16 Martin A, Baker TA, Sauer RT. Distinct static and dynamic interactions control ATPase-peptidase communication in a AAA⁺ protease. *Mol Cell* 2007; 27(1): 41-52.
- 17 Lee ME, Baker TA, Sauer RT. Control of substrate gating and translocation into ClpP by channel residues and ClpX binding. *J Mol Biol* 2010; 399(5): 707-18.
- 18 Ingvarsson H, Mate MJ, Högbohm M, Portnoi D, Benaroudj N, Alzari PM, *et al*. Insights into the inter-ring plasticity of caseinolytic proteases from the X-ray structure of *Mycobacterium tuberculosis* ClpP1. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2007; 63(Pt 2): 249-59.
- 19 Flynn JM, Neher SB, Kim YI, Sauer RT, Baker TA. Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol Cell* 2003; 11(3): 671-83.
- 20 Baker TA, Sauer RT. ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1823(1): 15-28.
- 21 Neher SB, Villen J, Oakes EC, Bakalarski CE, Sauer RT, Gygi SP, *et al*. Proteomic profiling of ClpXP substrates after DNA damage reveals extensive instability within SOS regulon. *Mol Cell* 2006; 22(2): 193-204.
- 22 Gerth U, Krüger E, Derre I, Msadek T, Hecker M. Stress induction of the *Bacillus subtilis* clpP gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance. *Mol Microbiol* 1998; 28(4): 787-802.
- 23 Wawrzynow A, Wojtkowiak D, Marszałek J, Banecki B, Jonsen M, Graves B, *et al*. The ClpX heat-shock protein of *Escherichia coli*, the ATP-dependent substrate specificity component of the ClpP-ClpX protease, is a novel molecular chaperone. *EMBO J* 1995; 14(9): 1867-77.
- 24 Msadek T, Dartois V, Kunst F, Herbaud ML, Denizot F, Rapoport G. ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol Microbiol* 1998; 27(5): 899-914.
- 25 Frank EG, Ennis DG, Gonzalez M, Levine AS, Woodgate R. Regulation of SOS mutagenesis by proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(19): 10291-6.
- 26 Park CY, Kim EH, Choi SY, Tran TD, Kim IH, Kim SN, *et al*. Virulence attenuation of *Streptococcus pneumoniae* clpP mutant by sensitivity to oxidative stress in macrophages via an NO-mediated pathway. *J Microbiol* 2010; 48(2): 229-35.
- 27 Robertson GT, Ng WL, Foley J, Gilmour R, Winkler ME. Global transcriptional analysis of clpP mutations of type 2 *Streptococcus pneumoniae* and their effects on physiology and virulence. *J Bacteriol* 2002; 184(13): 3508-20.
- 28 Ko KS, Park S, Oh WS, Suh JY, Oh T, Ahn S, *et al*. Comparative analysis of growth-phase-dependent gene expression in virulent and avirulent *Streptococcus pneumoniae* using a high-density DNA microarray. *Mol Cells* 2006; 21(1): 82-8.
- 29 Kerr AR, Wei XQ, Andrew PW, Mitchell TJ. Nitric oxide exerts distinct effects in local and systemic infections with *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* 2004; 36(6): 303-10.

- 30 Zugel U, Kaufmann SH. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(1): 19-39.
- 31 Frees D, Ingmer H. ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* 1999; 31(1): 79-87.
- 32 Porankiewicz J, Wang J, Clarke AK. New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. *Mol Microbiol* 1999; 32(3): 449-58.
- 33 Jenal U, Shapiro L. Cell cycle-controlled proteolysis of a flagellar motor protein that is asymmetrically distributed in the *Caulobacter* predivisional cell. *EMBO J* 1996; 15(10): 2393-406.
- 34 Hensel M, Shea JE, Gleeson C, Jones MD, Dalton E, Holden DW. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* 1995; 269(5222): 400-3.
- 35 Frees D, Qazi SN, Hill PJ, Ingmer H. Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence. *Mol Microbiol* 2003; 48(6): 1565-78.
- 36 Robertson GT, Ng WL, Gilmour R, Winkler ME. Essentiality of clpX, but not clpP, clpL, clpC, or clpE, in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Bacteriol* 2003; 185(9): 2961-6.
- 37 Lemos JA, Burne RA. Regulation and Physiological Significance of ClpC and ClpP in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 2002; 184(22): 6357-66.
- 38 Hinzen B, Raddatz S, Paulsen H, Lampe T, Schumacher A, Habich D, et al. Medicinal chemistry optimization of acyldepsipeptides of the enopeptin class antibiotics. *ChemMedChem* 2006; 1(7): 689-93.
- 39 Kirstein J, Hoffmann A, Lilie H, Schmidt R, Rubsamen-Waigmann H, Brotz-Oesterhelt H, et al. The antibiotic ADEP reprogrammes ClpP, switching it from a regulated to an uncontrolled protease. *EMBO Mol Med* 2009; 1(1): 37-49.
- 40 Lee BG, Park EY, Lee KE, Jeon H, Sung KH, Paulsen H, et al. Structures of ClpP in complex with acyldepsipeptide antibiotics reveal its activation mechanism. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17(4): 471-8.
- 41 Gamba P, Veening JW, Saunders NJ, Hamoen LW, Daniel RA. Two-step assembly dynamics of the *Bacillus subtilis* divisome. *J Bacteriol* 2009; 191(13): 4186-94.
- 42 Adams DW, Errington J. Bacterial cell division: Assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7(9): 642-53.
- 43 Li DH, Chung YS, Gloyd M, Joseph E, Ghirlando R, Wright GD, et al. Acyldepsipeptide antibiotics induce the formation of a structured axial channel in ClpP: A model for the ClpX/ClpA-bound state of ClpP. *Chem Biol* 2010; 17(9): 959-69.
- 44 de Sagarra MR, Mayo I, Marco S, Rodriguez-Vilarino S, Oliva J, Carrascosa JL, et al. Mitochondrial localization and oligomeric structure of hClpP, the human homologue of *E. coli* ClpP. *J Mol Biol* 1999; 292(4): 819-25.
- 45 Matsushima Y, Kaguni LS. Matrix proteases in mitochondrial DNA function. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1819(9/10): 1080-7.
- 46 Bross P, Andresen BS, Knudsen I, Kruse TA, Gregersen N. Human ClpP protease: cDNA sequence, tissue-specific expression and chromosomal assignment of the gene. *FEBS Lett* 1995; 377(2): 249-52.
- 47 Wong P, Houry WA. Chaperone networks in bacteria: Analysis of protein homeostasis in minimal cells. *J Struct Biol* 2004; 146(1/2): 79-89.
- 48 Kang SG, Ortega J, Singh SK, Wang N, Huang NN, Steven AC, et al. Functional proteolytic complexes of the human mitochondrial ATP-dependent protease, hClpXP. *J Biol Chem* 2002; 277(23): 21095-102.
- 49 Peltier JB, Ripoll DR, Friso G, Rudella A, Cai Y, Ytterberg J, et al. Clp protease complexes from photosynthetic and non-photosynthetic plastids and mitochondria of plants, their predicted three-dimensional structures, and functional implications. *J Biol Chem* 2004; 279(6): 4768-81.
- 50 Kang SG, Maurizi MR, Thompson M, Mueser T, Ahvazi B. Crystallography and mutagenesis point to an essential role for the N-terminus of human mitochondrial ClpP. *J Struct Biol* 2004; 148(3): 338-52.
- 51 Kang SG, Dimitrova MN, Ortega J, Ginsburg A, Maurizi MR. Human mitochondrial ClpP is a stable heptamer that assembles into a tetradecamer in the presence of ClpX. *J Biol Chem* 2005; 280(42): 35424-32.
- 52 Corydon TJ, Wilsbech M, Jespersgaard C, Andresen BS, Borglum AD, Pedersen S, et al. Human and mouse mitochondrial orthologs of bacterial ClpX. *Mamm Genome* 2000; 11(10): 899-905.
- 53 Jenkinson EM, Rehman AU, Walsh T, Clayton-Smith J, Lee K, Morell RJ, et al. Perrault syndrome is caused by recessive mutations in CLPP, encoding a mitochondrial ATP-dependent chambered protease. *Am J Hum Genet* 2013; 92(4): 605-13.
- 54 Gispert S, Parganlija D, Klinkenberg M, Drose S, Wittig I, Mittelbronn M, et al. Loss of mitochondrial peptidase Clpp leads to infertility, hearing loss plus growth retardation via accumulation of CLPX, mtDNA and inflammatory factors. *Hum Mol Genet* 2013; 22(24): 4871-87.
- 55 Goard CA, Schimmer AD. Mitochondrial matrix proteases as novel therapeutic targets in malignancy. *Oncogene* 2013; 33(21): 2690-99.