

# 真核细胞伴侣素CCT及其与细胞骨架的关系

段芳蕾<sup>1</sup> 孙兴旺<sup>1\*</sup> 曹 灵<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>泸州医学院病理学教研室, 泸州 646000; <sup>2</sup>泸州医学院附属医院肾病内科, 泸州 646000)

**摘要** CCT(the chaperonin containing tailless complex polypeptide 1)是一种广泛存在于细胞浆中的异型寡聚蛋白,也是迄今为止真核细胞胞浆中发现的唯一伴侣素。目前认为大约15%的哺乳动物蛋白折叠需要CCT的参与,其中研究得最多的是肌动蛋白和微管蛋白。研究发现,CCT的异常会导致细胞骨架蛋白发生改变,甚至影响细胞骨架的形成与解聚。由此推测,一些细胞骨架相关疾病可能与CCT异常有关。

**关键词** 伴侣素; CCT; 细胞骨架; 肌动蛋白; 微管蛋白

## 1 引言

分子伴侣家族包括Hsp100、Hsp90、Hsp70、伴侣素(Hsp60)、DnaJ(Hsp40)和Hsp27家族蛋白,它们在细胞内蛋白质的折叠过程中发挥着重要的作用。伴侣素(Hsp60)家族广泛存在于生物界,古细菌中的TF55、真细菌中的GroEL和真核细胞中的CCT都属于这一家族。Archa分型将伴侣素(Hsp60)分为I型和II型两型。I型主要存在于真细菌和真核细胞的细胞器(线粒体、叶绿体)中,以GroEL的研究最为广泛。II型只存在于古细菌和真核细胞的胞浆中,在蛋白质序列上与I型有弱相似性,但结构和成分还是有较大的异源性<sup>[1]</sup>。CCT属于II型伴侣素,存在于所有真核细胞的胞浆中,对酵母菌至关重要<sup>[2]</sup>。随着研究的深入,许多蛋白质被发现与CCT相互作用,CCT底物谱被不断增大,底物中最重要、研究得最多的是肌动蛋白和微管蛋白。本文就CCT与肌动蛋白、微管蛋白及其构成的细胞骨架间的关系作一综述。

## 2 CCT结构及功能

1979年, Silver等<sup>[3]</sup>自小鼠睾丸组织中分离出一种高表达的多肽,命名为t-复合多肽1(tailless complex polypeptide 1, TCP-1),后来发现TCP-1是CCT的 $\alpha$ 亚基; CCT是一种广泛存在于细胞浆中的异型寡聚蛋白,也是迄今为止真核细胞胞浆中发现的唯一伴侣素<sup>[4]</sup>。

CCT是大分子的聚合物,由“背靠背”堆叠的双环状亚基构成含有中央腔的桶状结构。CCT的环由8个不同的亚基构成,分别称为 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 、

$\eta$ 和 $\theta$ (在酵母菌中命名为Cct1至Cct8),只在哺乳动物睾丸中发现组织特异性亚基 $\zeta$ -2。每个亚基都由不同的基因编码,并且每个亚基在环中的位置固定<sup>[5]</sup>。8个亚基相互间的氨基酸相似性约为25%至35%。Amit等<sup>[6]</sup>通过分别对八个亚基的相同的氨基酸残基(与ATP结合的重要部位)诱导突变,导致细胞出现完全不同的表型,说明每个亚基的功能不同。每个环(包括环中的每个亚基)包含三个结构域:位于桶状结构两端的顶端域,两个环相接触的赤道域和链接顶端域与赤道域的中间域。顶端域含有底物结合位点,赤道域含有ATP结合位点,环内和环间结合点,中间域传递因ATP引起的从赤道域到顶端域的构象改变。与GroEL需要辅助分子GroES作为其桶状结构的“盖子”不同,CCT自身具有“盖子”结构。当与ATP结合后,CCT八个亚基的顶端域发生构象变化,分别向中央腔伸出一条柔软的 $\alpha$ 螺旋结构,起到类似GroES“盖子”的作用<sup>[7]</sup>。目前,运用免疫标记单粒子冷冻电子显微镜和三维重建技术,已经明确了CCT双环的环内和环间各亚基的空间结构<sup>[8]</sup>。

因为CCT各亚基在环中的位置固定,CCT的底物必须具有一个氨基酸序列特异的甚至是空间构象特异的结合位点。目前认为大约15%的哺乳动物蛋白折叠需要CCT的参与。CCT的底物可以分为几类<sup>[9]</sup>:第一种是必须折叠的底物,如肌动蛋白和

收稿日期: 2010-11-27 接受日期: 2011-03-01

四川省教育厅重点项目(No.2006A049)和泸州市科技局项目(No.2007(64)-2)资助项目

\*通讯作者。Tel/Fax: 0830-3160331, E-mail: lysunxw@163.com

微管蛋白, 它们必须依靠与CCT作用而折叠成为其天然构象; 第二种是偶尔结合的蛋白, 这一类可能只是偶尔使用CCT的伴侣素活性, 而通常并不需要与CCT作用而达到其生物结构; 第三类蛋白质利用CCT作为平台完成其复杂的装配, 例如Von Hippel Lindau(VHL)肿瘤抑制蛋白; 第四类蛋白质调节CCT的活性。越来越多的CCT底物被报道, 包括细胞周期调节蛋白(Cdc20p、Cdh1p、马球象激酶1和周期素E)、VHL肿瘤抑制蛋白和含有WD重复序列的蛋白质家族成员<sup>[4]</sup>。Cdc20p通过其WD重复序列与CCT结合<sup>[10]</sup>。

CCT需要一些协同因子和辅助折叠蛋白的存在以完成其对底物的折叠, 包括光传感因子样蛋白(PhLPs), 其与CCT作用, 调节CCT的底物折叠功能。还有前折叠蛋白(prefoldin, PFD), 一种异源六聚体伴侣素, 其作用是稳定新合成的肌动蛋白和微管蛋白, 并短暂的与CCT合作, 协助将这些底物传送至CCT中央腔内。

### 3 CCT与肌动蛋白和微管蛋白的折叠

肌动蛋白和微管蛋白是细胞骨架蛋白的主要成分, 在真核细胞胞浆中含量极为丰富。体外实验证明CCT能够加速肌动蛋白<sup>[11]</sup>和微管蛋白<sup>[12]</sup>的折叠, 体内实验显示CCT可以与新合成的肌动蛋白和微管蛋白结合。在筛选引起酵母细胞骨架缺陷的突变体实验中证实多个CCT亚单位的突变均可导致细胞骨架缺陷的发生<sup>[13-14]</sup>。

肌动蛋白和微管蛋白都是与开放状态的CCT结合, 二者直接与CCT的亚基结合, 而非单纯的被CCT中央腔包绕。CCT有两个亚基与肌动蛋白结合相关, 而与微管蛋白结合的亚基有五个。免疫显微镜得到的CCT-肌动蛋白复合物和CCT-微管蛋白复合物的结构显示, 肌动蛋白和微管蛋白与CCT的结合有两种作用模式<sup>[15]</sup>。肌动蛋白是由一大一小两个结构域构成的蛤蚌形, 两结构域间有腺苷酸结合位点。其小结构域(主要是N端区域)与CCT $\delta$ 结合, 大结构域(主要是C端区域)与CCT $\beta$ 或CCT $\epsilon$ 结合。微管蛋白与CCT的结合稍复杂些, 涉及到其N端结构域与CCT $\alpha$ 和CCT $\eta$ 的相互作用和C端结构域与CCT $\beta$ 、CCT $\gamma$ 和CCT $\theta$ 的相互作用, 或者是N端结构域与CCT $\delta$ 和CCT $\theta$ 的相互作用以及C端结构域与CCT $\epsilon$ 、CCT $\zeta$ 和CCT $\beta$ 的相互作用。

在无ATP的情况下, 可以看见肌动蛋白与CCT $\delta$ 和CCT $\beta$ 或CCT $\delta$ 和CCT $\epsilon$ 结合。Neiryneck等<sup>[16]</sup>认为肌动蛋白先与CCT $\beta$ 或CCT $\epsilon$ 结合, 再与CCT $\delta$ 结合, 并且发现与肌动蛋白结合的蛋白质CAP可能是其折叠的最后阶段的辅助因子。综合来看, CCT与底物是以静电模式结合并且折叠过程中并不完全包纳底物。CCT可以和已经具有二级结构的中间折叠形态的底物结合并反应。Stemp等<sup>[17]</sup>和Pappenberger等<sup>[18]</sup>都证实, 在大肠埃希氏菌溶菌液的体外翻译体系中形成的肌动蛋白和微管蛋白的稳定的折叠中间态可以在CCT存在的条件下进一步折叠成为天然态。新合成的肌动蛋白也必须在CCT存在的情况下才能完成正确的折叠, GroEL不能替代。目前, 仍不清楚肌动蛋白和微管蛋白在和CCT作用时他们的构象发生了哪些具体变化, 可能是CCT表面域的机械性协助克服了折叠中的一些问题, 或者是保持了底物空间结构的开放状态使其可以和核苷酸结合。实验证实, 在微管蛋白和CCT结合的过程中其GTP结合位点变得成熟<sup>[19]</sup>。

### 4 CCT与微丝、微管的组装

一些证据表明, CCT对细胞骨架的影响作用不仅仅局限于折叠新合成的多肽, 还包括参与微丝微管的装配与聚合。Brackley等<sup>[20]</sup>通过siRNA技术证实离体实验中, 一些CCT亚基定位于微丝上, 其细胞内水平改变时会影响细胞骨架解聚后的组装, 进而影响细胞形态。不同亚基的胞内水平的改变, 对细胞形态的影响不同, 分别对CCT $\zeta$ <sup>[21]</sup>和CCT $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\eta$ 、 $\theta$ 的siRNA靶向干扰都导致细胞增大、变扁平。但是靶向CCT $\epsilon$ 时, 多数细胞变得狭长。免疫荧光染色证实, 靶向CCT $\epsilon$ 时细胞内被药物解聚的微丝的重建速率变慢, 靶向CCT $\zeta$ 的细胞和对照组细胞的重建速率似乎相似, 说明CCT亚基单体形式对微丝的形成有重要作用。

在体外实验中, 一些CCT亚基是微管辅助蛋白, 不仅仅是单纯的协助新合成微管蛋白的折叠, 也参与微管形成的细胞骨架的延伸<sup>[22]</sup>。Seixas等<sup>[23]</sup>证实CCT $\alpha$ 和CCT $\delta$ 对四膜虫纤毛的组装和维持至关重要, 失去CCT $\alpha$ p和CCT $\delta$ p的细胞缺乏胞质和胞膜下的微管, 轴丝也存在结构缺陷, 不能再形成纤毛。白色念珠菌的菌丝需要肌动蛋白和微管蛋白的组装才能形成, 当CCT $\theta$ 亚基过度表达时其形成受到阻

碍<sup>[24]</sup>。在啤酒酵母中, 单体形式的Cct-6p过表达可以抑制由于Sit4p和Sap155p过表达及Ist8-2、rsp5-9、tor2-21突变引起的异常表型, 说明CCT亚基可能作为螯合蛋白存在<sup>[25]</sup>。Tam等<sup>[26]</sup>用啤酒酵母证实CCT1和CCT4的过表达可以导致多聚聚合形态的改变, 说明CCT亚基可能保留了一些在伴侣素形态下的功能活性。而且他们证明了离体实验中单独的Cct1p的顶端底物结合域可以抑制多聚聚合。Brackley等<sup>[20]</sup>证实, 不管是CCT聚合体或其亚基单体的水平改变, 都会导致微管形成速率的增加。

## 5 CCT与细胞骨架相关蛋白

Brackley等<sup>[27]</sup>发现凝溶胶蛋白(一种微丝剪切蛋白)是CCT结合蛋白, 尽管它不是经典的折叠底物, 但是凝溶胶蛋白与CCT间的结合具有一定程度的特异性。在培养细胞试验中, CCT单体水平影响凝溶胶蛋白水平, 提示通过剪切与封端蛋白介导的CCT与细胞骨架间的联系。

细丝蛋白(微丝间的交联蛋白)在胰岛素信号通路中起负性调节。Doucey等<sup>[28]</sup>证实细丝蛋白与窖蛋白-1(caveolin-1, 脂筏结构的主要结构蛋白)相互作用, 使得胰岛素诱导的窖蛋白-1磷酸化恢复, 从而激活TCP-1进行蛋白质折叠。

## 6 展望

细胞骨架与细胞的许多重要生理功能有关, 如内皮细胞通透性、单核细胞的变形运动、细胞周期等。细胞骨架的异常会导致细胞功能异常, 从而导致疾病的发生。心血管系统疾病的发生与内皮细胞损伤、内皮通透性改变有关, 肾病综合征蛋白尿的形成也涉及到内皮通透性问题, 炎症细胞变形能力的改变会导致免疫系统疾病, 微管数量减少是恶性转化细胞的一个重要特征。CCT与细胞骨架间的紧密联系让我们有理由推测, CCT的改变可能与细胞骨架相关疾病的发病机制有关。

事实上, 对许多疾病的研究都发现了CCT及其亚基的异常。由此推测, CCT可能成为一些疾病检测及治疗的新靶点。目前, 对CCT的研究已经比较深入, 虽然了解了CCT对细胞生理功能的重要性以及CCT在许多疾病中有改变, 但是, CCT在疾病发生中的作用的研究还很少看到。随着科技的发展和研究的深入, CCT与疾病的关系会更加清楚地被揭示,

从而为疾病的研究带来新的方向。

## 参考文献(References)

- 1 常晓燕, 陈杰. 伴侣素CCT的结构及与肌动蛋白、微管蛋白的作用机制. 国外医学(生理、病理科学与临床分册) 2003; 23(6): 596-8.
- 2 Stoldt V, Rademacher F, Kehren V, Ernst JF, Pearce DA, Sherman F. Review: The Cct eukaryotic chaperonin subunits of *Saccharomyces cerevisiae* and other yeasts. *Yeast* 1996; 12(6): 523-9.
- 3 Silver LM, Artzl K, Bennett D. A major testicular cell protein specified by a mouse T/t complex gene. *Cell* 1979; 17(2): 275-84.
- 4 Horwich AL, Fenton WA, Chapman E, Farr GW. Two families of chaperonin: Physiology and mechanism. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 115-45.
- 5 Liou AK, Willison KR. Elucidation of the subunit orientation in CCT (chaperonin containing TCP1) from the subunit composition of CCT micro-complexes. *EMBO J* 1997; 16: 4311-6.
- 6 Amit M, Weisberg SJ, Nadler-Holly M, McCormack EA, Feldmesser E, Kaganovich D, *et al.* Equivalent mutations in the eight subunits of the chaperonin CCT produce dramatically different cellular and gene expression phenotypes. *J Mol Biol* 2010; 401(3): 532-43.
- 7 Ditzel L, Löwe J, Stock D, Stetter KO, Huber H, Huber R, *et al.* Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT. *Cell* 1998; 93(1): 125-38.
- 8 Martin-Benito J, Grantham J, Boskovic J, Brackley KI, Carascosa JL, Willison KR, *et al.* The inter-ring arrangement of the cytosolic chaperonin CCT. *EMBO Rep* 2007; 8(3): 252-7.
- 9 Brackley KI, Grantham J. Activities of the chaperonin containing TCP-1(CCT): Implications for cell cycle progression and cytoskeletal organisation. *Cell Stress Chaperones* 2009; 14(1): 23-31.
- 10 Camasses A, Bogdanova A, Shevchenko A, Zachariae W. The CCT chaperonin promotes activation of the anaphase-promoting complex through the generation of functional Cdc20. *Mol Cell* 2003; 12(1): 87-100.
- 11 Gao YJ, Thomas JO, Chow RL, Lee GH, Cowan NJ. A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding. *Cell* 1992; 69(6): 1043-50.
- 12 Frydman J, Nimmesgern E, Erdjument-Bromage H, Wall JS, Tempst P, Hartl FU. Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits. *EMBO J* 1992; 11(13): 4767-78.
- 13 Chen X, Sullivan DS, Huffaker TC. Two yeast genes with similarity to TCP-1 are required for microtubule and actin function *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(19): 9111-5.
- 14 Vinh DB, Drubin DG. A yeast TCP-1-like protein is required for actin function *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(19): 9116-20.
- 15 Llorca O, Martín-Benito J, Ritco-Vonsovici M, Grantham J,



- Hynes GM, Willison KR, *et al.* Eukaryotic chaperonin CCT stabilizes actin and tubulin folding intermediates in open quasi-native conformations. *EMBO J* 2000; 19(22): 5971-9.
- 16 Neiryneck K, Waterschoot D, Vandekerckhove J, Ampe C, Rommelaere H. Actin interacts with CCT via discrete binding sites: A binding transition-release model for CCT mediated actin folding. *J Mol Biol* 2006; 355(1): 124-38.
- 17 Stemp MJ, Guha S, Hartl FU, Barral JM. Efficient production of native actin upon translation in a bacterial lysate supplemented with the eukaryotic chaperonin TRiC. *Biol Chem* 2005; 386(8): 753-7.
- 18 Pappenberger G, McCormack EA, Willison KR. Quantitative actin folding reactions using yeast CCT purified via an internal tag in the CCT3/ $\gamma$  subunit. *J Mol Biol* 2006; 360(2): 484-96.
- 19 Lewis SA, Tian G, Cowan NJ. The alpha- and beta-tubulin folding pathways. *Trends Cell Biol* 1997; 7(12): 479-84.
- 20 Brackley KI, Grantham J. Subunits of the chaperonin CCT interact with F-actin and influence cell shape and cytoskeletal assembly. *Exp Cell Res* 2010; 316(4): 543-53.
- 21 Grantham J, Brackley KI, Willison KR. Substantial CCT activity is required for cell cycle progression and cytoskeletal organization in mammalian cells. *Exp Cell Res* 2006; 312(12): 2309-24.
- 22 Roobol A, Sahyoun ZP, Carden MJ. Selected subunits of the cytosolic chaperonin associate with microtubules assembled *in vitro*. *J Biol Chem* 1999; 274(4): 2408-15.
- 23 Seixas C, Cruto T, Tavares A, Gaertig J, Soares H. CCT $\alpha$  and CCT $\delta$  chaperonin subunits are essential and required for cilia assembly and maintenance in *Tetrahymena*. *PLoS One* 2010; 5(5): e10704.
- 24 Rademacher F, Kehren V, Stoldt VR, Ernst JF. A *Candida albicans* chaperonin subunit (CaCct8p) as a suppressor of morphogenesis and Ras phenotypes in *C. albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 1998; 144 (Pt 11): 2951-60.
- 25 Kabir MA, Kaminska J, Segel GB, Bethlendsy G, Lin P, Della Seta F, *et al.* Physiological effects of unassembled chaperonin Cct subunits in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2005; 22(3): 219-39.
- 26 Tam S, Geller R, Spiess C, Frydman J. The chaperonin TRiC controls polyglutamine aggregation and toxicity through subunit-specific interactions. *Nat Cell Biol* 2006; 8(10): 1155-62.
- 27 Brackley KI, Grantham J. Interactions between the actin filament capping and severing protein gelsolin and the molecular chaperone CCT: Evidence for nonclassical substrate interactions. *Cell Stress Chaperones* 2011; 16(2): 173-9.
- 28 Doucey MA, Bender FC, Hess D, Hofsteenge J, Bron C. Caveolin-1 interacts with the chaperone complex TCP-1 and modulates its protein folding activity. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63(7-8): 939-48.

## The Chaperonin Containing Tailless Complex Polypeptide 1 (CCT) and Its Relationship with the Cytoskeleton

Duan Fanglei<sup>1</sup>, Sun Xingwang<sup>1\*</sup>, Cao Ling<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China;

<sup>2</sup>Department of Nephrology, Luzhou Medical College Affiliated Hospital, Luzhou 646000, China)

**Abstract** CCT (the chaperonin containing tailless complex polypeptide 1) is a hetero-oligomeric protein widely existing in the cytoplasm, and is also the only chaperonin so far found in eukaryotic cytoplasm. In present opinion, about 15 percent of mammalian proteins folding need CCT participation. The most studied CCT substrates are actin and tubulin. It was found that abnormal CCT would lead to the changes of cytoskeletal proteins, and even affect the formation and depolymerization of cytoskeleton. It is inferred that a number of cytoskeleton-related diseases may be associated with CCT abnormalities.

**Key words** chaperonin; CCT; cytoskeleton; actin; tublin

Received: November 27, 2010 Accepted: March 1, 2011

This work was supported by the Key Project of Sichuan Education Department (No.2006A049) and Luzhou Science and Technology Bureau Project (No.2007(64)-2)

\*Corresponding author. Tel/Fax: 86-830-3160331, E-mail: lysunxw@163.com