

- [14] Kato, Y. and Iwamoto, M., 1990, *J. Biol. Chem.*, **265**, 5903—5909.
- [15] Kato, Y. et al., 1991, *Methods in Enzymology*, **198**, 416—424.
- [16] Takata, K. et al., 1984, *Cell Differ.*, **14**, 25—31.
- [17] Yan, W. et al., 1990, *J. Biol. Chem.*, **265**: 13125—13131.

## 分子伴侣研究概况

王润华

(军事医学科学院基础医学研究所 北京 100850)

目前虽然已经搞清楚了数百种蛋白质的三级结构,但是对这些蛋白质是怎样达到它们最终构象的过程却知之不多。过去的教科书往往告诉人们多肽链在核糖体上合成并释放后会自发地折叠成具有生物学活性的天然构象。但目前这种“自装配”的观点已遭到严重的挑战。在新生多肽的运输、折叠及组装过程中,有一类被称为“分子伴侣(molecule chaperone)”<sup>[1]</sup>的蛋白质起到非常重要的作用。

目前分子伴侣主要是指在进化上非常保守的热休克蛋白(heat shock protein 或 HSP)的几个家族。在正常情况下,从细菌到哺乳动物,热休克蛋白或其类似物对维持细胞正常的生命活动是不可缺少的。但是在一些应激条件下,特别是在热休克状态,这类蛋白的表达量会突然增加。目前作为分子伴侣的热休克蛋白主要包括三个家族,即 hsp 70 家族, hsp 90 家族和 hsp 60(chaperonin, 伴侣蛋白)家族。现已发现分子伴侣在蛋白质的折叠、组装及解离、错叠(misfolding)多肽的降解过程中起到非常重要的作用。本文对这几种分子伴侣家族的构成,它们在蛋白质的运输、折叠和装配等过程中的作用以及它们在生物工程下游处理过程中的应用作简要介绍。

### 一、hsp 70 家族

虽然早已认识到 hsp 70 在热休克反应中的作用,但只是到近年才知道 hsp 70 作为分子伴侣在细胞中蛋白质折叠、组装、解离及降

解等过程中起到很重要的作用。hsp 70 家族的成员在结构上非常保守,它们包括大肠杆菌中的 Dnak, 酵母中的 Ssa 1 p 和 Ssa 2 p; 内质网中的 Kar 2 p 及其线粒体中的 Ssc 1 p; 哺乳动物细胞中的胞浆蛋白 hsp70, hsc 70 及 prp 73 及其内质网中的 Bip, 植物细胞叶绿体中的 ct-hsp 70 等。

首先被研究的 hsp 70 家族的成员是大肠杆菌中的 Dnak, 它与另外两种热休克蛋白, DnaJ 和 GrpE 共同协助噬菌体的复制<sup>[2]</sup>。此外 Dnak 还可以促进未折叠(unfolded)的外源蛋白的稳定<sup>[3]</sup>, 协助 Lac Z 杂交蛋白从细胞内膜输出<sup>[4]</sup>。

在真核细胞的胞浆中,在热休克条件下,核蛋白体部分失活形成不溶的凝聚物。hsp 70 或 hsc 70 可以促进这类不溶物的解聚。在酵母细胞中, Ssa 1 p 和 Ssa 2 p 可以结合未折叠的线粒体蛋白或分泌蛋白前体,使它们保持一种具有转位能力的状态(translocation-competent state),并促进它们转位进入内质网和线粒体<sup>[5,6]</sup>。hsc 70 还可以短暂地结合胞浆蛋白以促进它们在胞浆中的正确折叠和组装。此外, hsc 70 还可以与网格蛋白(clathrin)轻链结合,促进网格蛋白包被颗粒的脱壳,从而促进笼罩(cages)的解离<sup>[7]</sup>。最后,该家族的另一个成员 prp 73 能识别和结合含有 KFERQ 序列的多肽,导致细胞内蛋白被溶酶体降解<sup>[8]</sup>。

在哺乳动物细胞内质网中的 hsp 70 家族成员,最初被认作免疫球蛋白的重链结合蛋

白(Bip)和葡萄糖调节蛋白(grp 78)。Bip可以协助新生多肽的转位,促进新生多肽在内质网腔的折叠和组装以及与外源蛋白结合使之保持在未折叠状态<sup>[9]</sup>。

在酵母、眼藻、锥体虫和哺乳动物细胞的线粒体中均有 hsp 70 家族的成员存在。在线粒体基质中的 hsp 70 可以与尚未完全跨膜进入线粒体基质的多肽前体结合,使之保持在未折叠状态,在线粒体基质中其它的分子伴侣如 hsp 60 的作用下,使多肽前体折叠组装成自然构象<sup>[10]</sup>。

最近,在植物细胞的叶绿体中也发现有 hsp 70 家族成员的存在,称为 ct-hsp 70,它可以结合光合系统Ⅱ中主要的光捕获复合体(pLHCP)的前体以防止其再折叠(refolding),并使之插入到类囊体(thylakoid)上<sup>[11]</sup>。

目前对 hsp 70 家族各成员的具体作用机制并不很清楚,但是这类蛋白的作用机制也有一些共同之处:(1)所有的 hsp70 对 ATP 具有高亲和力,而像 Dnak 和 hsc 70 还有微弱的 ATPase 活性。hsp 70 与靶肽结合或解离时,ATP 与 hsp 70 结合而导致其构象的变化,而这种变化对靶肽的未折叠构象起稳定作用,防止不适当的分子间或分子内相互作用导致靶肽的错叠或凝聚。ATP 的水解促进了与 hsp 70 结合的靶肽的释放,并使之继续折叠成自然构象;(2)识别不同的靶肽并调节它们的构象及装配状态。目前看来所有的 hsp 70 家族成员并无底物专一性;(3)在行使功能时需要其它的分子伴侣(如 hsp 60 家族)或细胞因子辅助;(4)在细胞的适当部位如胞浆中未折叠蛋白的累积可以诱导不同的 hsp 70 家族成员的合成。

## 二、hsp 60(伴侣蛋白, chaperonin)家族

这个家族的成员存在于所有的原核及真核细胞的某些细胞器如线粒体及叶绿体中,因此它们可能有共同的内共生起源。目前这类蛋白被重新命名为伴侣蛋白 60(cpn-60),它是由分子量各为 60 kD 的 14 个亚基组成,分上下两

层,每层由七个亚基组成<sup>[12]</sup>。在大肠杆菌中,cpn-60 的类似物是 GroEL,这种分子伴侣要发挥功能必须依赖 ATP,并与 GroES(伴侣蛋白-10, cpn-10)共同作用<sup>[13]</sup>。GroES 是由分子量约 10 kD 的七条多肽链形成的单环,是大肠杆菌中 GroE 操纵子的第二产物。在缺少未折叠蛋白底物的情况下, GroEL 的 ATPase 活性被 GroES 所抑制。在正常的生长条件下,这种分子伴侣对维持大肠杆菌的生存是不可缺少的。GroE 突变株与 Dnak 突变株的表型一样,使 DNA 和 RNA 的合成速率减慢,所有的蛋白酶活性降低。如果 GroEL 和 GroES 都表达过量的活,可以抑制许多不同基因的温度敏感突变,这是因为它们促进了突变多肽的正确折叠和组装<sup>[14]</sup>。在体外, GroEL 可以和  $\beta$ -内酰胺酶、proOmpA 及 prePhoE 等几种分泌蛋白的未折叠前体形成复合物。在体内, GroEL 对  $\beta$ -内酰胺酶的分泌是必要的,而对其他的分泌蛋白则不一定需要,这可能是因为有其他的原核分子伴侣,如引发因子(trigger factor)及 sec B 等来代替此功能。

在大肠杆菌中, GroE 可以促进原核细胞中的核酮糖二磷酸羧化酶(Rubisco),  $\beta$ -内酰胺酶前体,柠檬酸合成酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、二氢叶酸还原酶、硫氰酸酶及 GroEL 本身的折叠和装配。这些蛋白的部分折叠原聚体(proto-mer)与 GroEL 形成复合体,这样就防止了非特异性凝聚并使之自发再折叠。GroEL 并不与天然蛋白或不可逆的变性或凝聚分子作用,但可与易于折叠的中间体如“融球(molten globules)”<sup>[15]</sup>或“紧密中间体”<sup>[16]</sup>结合。在没有 GroES 存在的情况下, GroEL 水解 ATP 促进二元复合体的解离,使之释放部分折叠而无活性的多肽链,但能否释放天然活性分子要取决于多肽底物本身的性质。若 GroEL 重新结合已释放的多肽底物则可以抑制这种多肽的凝聚或继续折叠。若在 GroES 存在下,水解 ATP,多肽通过中间体构象在 GroES 表面发生折叠,但这时多肽并无活性,等到多肽从复合体上释

放以后才会产生有活性的天然构象。GroEL和GroES的这种协同作用,一般会在此情况下的再折叠比自发的再折叠效率更高;但就不同的蛋白质来讲,伴侣蛋白对折叠反应速率的影响差别是很大的,这种现象可能同多肽与伴侣蛋白的特异性作用是促进还是抑制在自发折叠过程中分子间的相互作用的限速步骤有关。

在高等植物叶绿体中的伴侣蛋白是一种由细胞核基因编码的蛋白,即Rubisco亚基结合蛋白,RBP<sup>[17]</sup>。它在植物的异源寡聚的Rubisco组装中起重要作用,与GroEL和线粒体中hsp 60的不同在于RBP是由 $\alpha$ 亚基(61 kD)和 $\beta$ 亚基(60 kD)两种成分组成双层的七元环<sup>[18]</sup>。

在四膜虫、酵母、玉米、非洲蟾蜍及人细胞的线粒体中含有与GroEL类似的分子伴侣。在酵母细胞线粒体中的hsp 60有近50%的氨基酸序列与GroEL和叶绿体RBP的 $\alpha$ 亚基相同。编码hsp 60的基因(HSP 60或MIF 4)突变后,某些线粒体酶尽管已经转位进入线粒体基质,在正常情况下也不能折叠成适当的大分子复合体<sup>[19]</sup>。不仅基质中的酶是如此,如 $F_1$ -ATPase的 $\beta$ -亚基及hsp 60本身,以及分布在周边空间中的细胞色素b<sub>2</sub>及Fe/S蛋白也是这样,后者作为折叠不完全的输入中间体累积在基质中。hsp 60直接与线粒体基质中的蛋白质折叠有关。如果由于没有ATP或经NEM处理或在低温条件下蛋白前体的装配受阻,那么未折叠的多肽就会与hsp 60形成大分子量复合体,加入ATP可以使多肽部分再折叠但不能促进它从复合体上释放。对于某些周边空间的蛋白质,如细胞色素b<sub>2</sub>,线粒体hsp 60可以稳定这些蛋白质的未折叠前体并协助它们通过线粒体内膜转位进入周边空间。

最近发现在小鼠细胞的胞浆中的t-复合体多肽-1(TCP-1蛋白)可以促进几种胞浆蛋白的折叠及微管的组装,其结构和作用方式与cpn-60相似,因此它可能是一种胞浆中的伴侣蛋白<sup>[20,21]</sup>。

### 三、hsp 90 家族

hsp 90 家族成员包括大肠杆菌中的HtpG、酵母和果蝇细胞质中的hsp 83、哺乳动物细胞质中的hsp 90及其内质网中的Grp 94。目前已经发现在细胞质中的hsp 90家族成员可以与许多细胞蛋白质,如逆转录病毒转化蛋白、类固醇激素受体、细胞蛋白激酶、肌动蛋白等相互作用<sup>[22]</sup>,使靶肽保持一种无活性的或未装配的形式。在体外,每个hsp 90二聚体可以结合1或2个靶肽分子以防止靶肽形成蛋白凝聚物,同时促进靶肽的正确折叠和组装。在hsp 90的作用过程中并不需要水解ATP<sup>[23]</sup>。

### 四、分子伴侣的作用方式比较

上述的几类分子伴侣在结构上有较大的同源性,其作用模式也有许多共同点,如都可以稳定蛋白质的未折叠状态并促进蛋白质折叠成具有生物活性的天然构象,但是这些分子伴侣在细胞中又都有其特定的作用范围,对维持细胞的正常生命活动发挥不同的作用。

在线粒体中,两种分子伴侣都可与未折叠的蛋白前体相互作用。hsp 70分子可以与尚未完全转位进入线粒体基质的多肽前体作用,而hsp 60的作用稍晚一点,hsp 70与折叠程度更低的结构单元相互作用,而hsp 60与折叠程度更高的折叠中间体作用。二维NMR表明Dnak结合新生多肽的延伸形式,而GroEL结合这种多肽的 $\alpha$ -螺旋构象<sup>[24]</sup>。

在多肽折叠过程中,这两种分子伴侣起到不同作用。hsp 70分子稳定其靶肽的未折叠形式,这种多肽从hsp 70分子上释放后才发生折叠,而结合在伴侣蛋白分子上的多肽至少有一部分已经开始折叠,可能是由于这两种分子伴侣的结构差别造成了这种结果。hsp 70分子只有一个单链结合位点,因此是作为单体与其靶肽结合,这样就抑制了靶肽的折叠直到靶肽从复合体上解离为止。与此相反,伴侣蛋白的功能单位是14个亚基的寡聚体,而且每次只

结合 1 或 2 个靶肽, 靶肽与伴侣蛋白的多肽结合可以使其某些部分发生折叠并开始释放, 而其余部分仍旧结合在分子伴侣的其他部位上。

在细胞质中, hsp 70、hsp 90 及 hsp 60 都可与新生多肽相互作用使之保持一种未折叠状态, 或者对转位的感受状态, 但是与 hsp 70 和 hsp 60 作用方式不同的是, hsp 90 与多肽链的结合及解离并不需要结合和水解 ATP。

### 五、分子伴侣在生物工程下游处理过程中的应用

在原核系统, 如大肠杆菌中表达异源蛋白通常会形成包涵体, 这是由于异源蛋白的过量表达而导致错折叠形成的不溶的凝聚物<sup>[26]</sup>。因此, 要得到具有生物活性的蛋白质往往用变性剂(如 6 mol/L 盐酸胍或 8 mol/L 尿素)将包涵体溶解后再使之在复性缓冲液中再折叠。复性过程是一个很微妙的过程, 其间诸如复性温度、盐离子浓度、蛋白质浓度及氧化还原环境等因素都影响到蛋白质的复性。在一般情况下复性的折叠中间体往往容易聚集而不容易再折叠到天然构象, 因此复性的效率都很低。

因此, 如何提高复性的效率是下游处理过程中的一个关键问题。如上所述的几类分子伴侣都可以与未折叠的蛋白前体结合防止发生错叠形成凝聚物, 并协助蛋白折叠形成天然构象。此外, DnaK 还可以溶解蛋白质凝聚物。Blum 等<sup>[26]</sup>报道如果使 DnaK 和人生长激素(HGH)一起在大肠杆菌中过量表达, 就可以明显地减少 HGH 包涵体和凝聚物的形成。这可能是细胞转译形成的 DnaK 与新合成的 HGH 前体结合并帮助它正确折叠从而减少了包涵体的形成。Buchner 等<sup>[27]</sup>报道, 在一种重组免疫毒素 B<sub>3</sub>(FV)-PE 38 KDEL 的复性过程中, 在 ATP 存在下, DnaK 可以阻止重组免疫毒素的非特异性凝聚, 而 GroEL/GroES 也可以很明显地提高具有活性的重组免疫毒素的得率。另外, 固相化的 DnaK 也可以促进这种重组免疫毒素的复性, 而且重复使用后对 DnaK 的活性也没有明

显的影响。因此, 可以设想分子伴侣很快将在生物工程下游处理过程中, 特别是蛋白质的复性过程中得到广泛的应用。

### 六、结 语

虽然人们早已认识到热休克蛋白的存在, 但是这些蛋白质作为“分子伴侣”在多肽折叠中的作用只是到近年才逐渐被认识。除热休克蛋白外, 目前已发现越来越多的多肽分子也可以促进蛋白质的折叠。但目前的一个主要问题是对于分子伴侣的具体作用机制并不太清楚。因此, 对涉及到促进多肽折叠的分子伴侣的具体分类和命名很不规范, 而且在实际的应用过程中并没有充分利用它们的价值。可以预料在不久的将来把分子伴侣的具体作用机制搞清楚以后, 不仅对蛋白质化学的基础理论会有较大的修正和补充, 而且也能为分子伴侣在基因工程中的实际应用提供理论依据。

### 摘 要

分子伴侣主要是在进化上高度保守的热休克蛋白的几个家族。从细菌到哺乳动物, 分子伴侣对体内蛋白质的折叠、运输和组装都起到非常重要的作用。本文简要地概述了分子伴侣的组成、它们在蛋白质折叠中的作用以及它们在生物工程下游处理过程中的应用情况。

### 参 考 文 献

- [1] Ellis R. J., 1991, *Annu. Rev. Biochem.*, 60: 321.
- [2] Lieberk K., et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. USA.*, 18: 6632.
- [3] Clarke C. F., et al., 1988, *Mol. cell Biol.*, 3: 1206.
- [4] Phillips G. J. and Silhavy T. J., 1990, *Nature*, 344: 882.
- [5] Chirico W. J., et al., 1988, *Nature*, 332: 805.
- [6] Deshaies R. J., et al., 1988, *Nature*, 332: 800.
- [7] Rothman J. and Schmid S. L., 1986, *Cell*, 46: 5.
- [8] Chiang H. L., et al., 1989, *Science*, 246:

- 382.
- [9] Bole D. G., et al., 1986, *J. Cell Biol.*, 102: 1558.
- [10] Kang P. L., et al., 1990, *Nature*, 348: 137.
- [11] Yalovsky S., et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. USA.*, 89: 5616.
- [12] McMullin T. W. and Hallberg R. L., 1988, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 371.
- [13] Georgopoulou C. and Ang D., 1990, *Semin. cell Biol.*, 1: 19.
- [14] Van Dyk T. K., et al., 1989, *Nature*. 342: 451.
- [15] Martin J., et al., 1991, *Nature*, 352: 36.
- [16] Creighton T. E., 1990, *Biochem. J.*, 270: 1.
- [17] Ellis J., 1990, *Science*, 250: 954.
- [18] Hemmingsen S. M., et al., 1988, *Nature*, 333: 330.
- [19] Cheng M., et al., 1989, *Nature*, 337: 620.
- [20] Yaffe M. B., et al., 1992, *Nature*, 358: 245.
- [21] Lewis V. A., et al., 1992, *Nature*, 358: 249.
- [22] Craig E. A. A., 1988, *Rev. Genet.*, 22: 631.
- [23] Wiech H., et al., 1992, *Nature*, 358: 169.
- [24] Landry S. L., et al., 1992, *Nature*, 355: 455.
- [25] Schein C. H., 1989, *Bio/Technology*, 7: 1141.
- [26] Blum P., et al., 1992, *Bio/Technology*, 10: 301.
- [27] Buchner J., et al., 1992, *Bio/Technology*, 10: 682.

## 胰岛冷冻保存方法研究进展

孙 洵 田志刚

(山东省医学科学院山东肿瘤生物治疗研究中心 济南 250001)

胰岛移植已给众多的胰岛素依赖型糖尿病患者带来了希望。但由于胰岛来源不足,在短期内收集十几个供体为同一个受体移植比较困难,同时存在胰岛移植中的排斥反应问题,从而限制了胰岛移植的推广和应用。自从1976年开始研究用冷冻的方法保存胰岛,试图通过冻存胰岛来满足胰岛移植量的要求,并在移植前进行HLA配型,以降低排斥反应,迄今已有许多学者成功地长期冻存了胰岛和胰腺组织<sup>[1-4]</sup>。我们在前人研究的基础上,成功地分离、纯化、培养人胚胎胰岛<sup>[5]</sup>,并且成功地冻存了人胚胎胰岛,临床实验研究取得明显疗效<sup>[6]</sup>,为大规模进行胰岛移植奠定了基础。本文综述了近年来国内外胰岛冻存方法的研究进展。

### 一、胰岛冻存前的体外培养

在胰岛移植中由于不能在短期内获得足够数量的胚胎胰岛,胰岛的体外培养是重要的。

但是胰岛在冻存前是否需要进行体外培养,特别是对其分泌功能有无影响是应该首先考虑的问题。Warnock等<sup>[7]</sup>进行了这方面的研究。实验结果提示新鲜分离的胰岛、直接冻存胰岛和体外培养48小时后冻存胰岛均在移植后使糖尿病小鼠的各项指标恢复正常。但冷冻保存胰岛移植后各项指标的恢复相应推迟,这可能与胰岛冻存复苏中的可逆性损伤的恢复有关。在冻存前经过培养与直接冻存,其胰岛活性的差别无显著性。

### 二、抗冻剂二甲基亚砜(DMSO)浓度的选择

已有研究表明,抗冻剂DMSO在不适当条件下对细胞具有毒性作用。胰岛在暴露于高浓度的DMSO后,可造成胰岛膜的损伤,使胰岛

本文经崔正言研究员审阅。