

关于小分子热休克蛋白 Hsp16.3 各功能区作用的初步研究*

常咏 李雪梅 饶子和**

清华大学结构生物学实验室, 北京 100084

摘要 小分子热休克蛋白 Hsp16.3 是一种存在于结核杆菌中的重要抗原, 具有小分子热休克蛋白家族成员典型的 3 个功能区: N 端疏水区, α -crystallin 域和 C 端较短的非保守区. 为了进一步研究其各功能区的作用, 我们定义了 Hsp16.3 的 3 个功能区并在大肠杆菌中分别克隆、表达和纯化了 N 端区或 C 端区缺失的两个 Hsp16.3 残体蛋白. 远紫外和近紫外圆二色谱分析结果显示, 残体蛋白表现出与野生型蛋白相似的二级和三级结构. 在九聚体野生型蛋白进行亚基重组装时, C 端缺失的 Hsp16.3 残体蛋白能与野生型蛋白发生相互作用, 形成异源寡聚体. 在对野生型蛋白进行胰酶消化时, Hsp16.3 的 α -crystallin 域对胰酶的消化具有抵抗能力. 所有这些结果显示: 在 Hsp16.3 的 3 个功能区中, α -crystallin 域是一个相对独立和稳定的结构单元, 它对该蛋白各级结构的维持十分重要.

关键词 小分子热休克蛋白 Hsp16.3 α -crystallin 域 重组装

小分子热休克蛋白是细胞受胁迫时大量合成的一类重要蛋白^[1], 在抑制细胞凋亡、组织细胞骨架装配、稳定 RNA 结构、保持晶状体的折光性等方面具有重要的功能^[2-5]. 近年来, 在肌肉相关疾病、某些肿瘤和神经退行性疾病中都发现小分子热休克蛋白的积聚; 而在结核杆菌和麻风杆菌中存在的小分子热休克蛋白则与该类细菌的侵染及体内长期潜伏密切相关^[6]. 为了进一步了解这个重要的蛋白家族, 我们对于一种在结核杆菌潜伏期主要表达的小分子热休克蛋白 Hsp16.3 进行了一些结构和功能研究. 相信这方面的工作对于揭示该家族蛋白的功能及了解结核杆菌的致病机理将大有裨益.

Hsp16.3 是一种存在于结核杆菌膜上的重要抗原蛋白, 由 144 个氨基酸组成, 分子质量为 16.3 ku, 通常由 3 个三聚体组装成稳定的九聚结构^[7]. 基因敲除实验表明, Hsp16.3 对结核杆菌在寄主巨噬细胞中的潜伏密切相关^[8]. 作为小分子热休克蛋白家族的成员之一, Hsp16.3 具有该家族蛋白典型的 3 个功能区: N 端疏水区, 近 C 端保守的 α -crystallin

域和长度较短的 C 端非保守区. 本研究通过将 Hsp16.3 与该家族获得结构解析的 Hsp16.5 在序列和结构上的比较, 定义了 Hsp16.3 的 3 个功能区. 为了进一步了解其各功能区的作用, 我们在大肠杆菌中分别克隆、表达和纯化了 N 端区或 C 端区缺失的两个 Hsp16.3 残体蛋白, 初步分析了末端功能区缺失对 Hsp16.3 基本结构及寡聚装配的影响.

1 材料与方法

1.1 N 端区或 C 端区缺失的两个 Hsp16.3 残体蛋白表达载体的构建

为了构建 N 端区或 C 端区缺失的两个 Hsp16.3 残体蛋白表达载体, 分别设计了如下两套 PCR 引物. N 端区缺失残体的引物是: 5' AATCGGATCC-CGGTCCACCTTCGACACCCGG3' 和 5' CCGACTC-GAGTCATTAGTTGGTGGACCCGGATCTG3'; C 端区缺失残体的引物是: 5' CCTCGGATCCGC-CACCACCCTTCCCGTTCAG3' 和 5' CCGACTC-

2003-03-10 收稿, 2003-04-29 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 30170197)

** 联系人, E-mail: raozh@xtal.tsinghua.edu.cn

GAGTCATTACTTTTCGGTTGGCTTCCC3'。在两套引物的上游都引入了 *Bam*HI 酶切位点,而在下游都引入了 *Xho*I 酶切位点。利用设计的引物进行 PCR(变性温度为 94℃ 30s,退火温度为 55℃ 30s,延伸温度为 72℃ 30s,共进行 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min),将扩增产物以 *Bam*HI, *Xho*I 双酶切后,与以同样双酶切的 P13 载体(该载体是对 pET16 进行适宜改造后得到的)进行连接并转化细菌 BL21(DE3)。

1.2 Hsp16.3 野生型及 N 或 C 端缺失残体蛋白的表达和纯化

Hsp16.3 野生型蛋白的表达与纯化见文献[7, 9]。两个残体蛋白能在 37℃ 用 IPTG 诱导进行可溶性表达。残体蛋白的纯化采用 Ni-NTA 亲和层析柱在非变性条件下进行。挂柱用缓冲液为 MCAC-0,洗杂蛋白用的咪唑梯度从 MCAC-20 到 MCAC-80。目标蛋白用 MCAC-200 进行洗脱。纯化后所得的目标蛋白用 SDS-PAGE 检测纯度。

1.3 远紫外和近紫外圆二色谱(CD)测定

圆二色谱的测定是在 Jasco J-715 spectropolarimeter 上进行的,测量光径是 1 mm。近紫外 CD 测定的蛋白浓度是 25 μ mol/mL,扫描范围为 250~300 nm。远紫外 CD 测定的蛋白浓度是 2.5 μ mol/mL,扫描范围为 200~250 nm。测定用缓冲液为 20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, pH 8.0。每条曲线都是 5 次测定的平均。

1.4 寡聚体亚基重组装后的共纯化

按照 Studer 等研究小分子热休克蛋白亚基交换时设计的共纯化实验^[10],首先将含野生型 Hsp16.3 (不带组氨酸亲和标记)与其 C 端区缺失残体蛋白(带组氨酸亲和标记)的菌体裂解液上清混合,用终浓度为 8 mol/L 的脲对混合液进行变性,以便打开混合液中预先存在于野生型与残体蛋白中的自身聚集体。然后用 Ni-NTA 柱的结合缓冲液对变性的蛋白混合液进行充分的透析复性,以便在混合液中模拟寡聚体重组装的过程。复性完成后,将经过重组装的蛋白混合液用 Ni-NTA 柱进行共纯化,SDS-PAGE 检测。

1.5 胰蛋白酶消化

将溶解于 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6) 中的野生型蛋白浓度调整为 1 mg/mL,加入终浓度为 2 μ g/

mL 胰蛋白酶,在 16℃ 进行反应。分别在 0, 2, 4, 8, 16, 24, 30, 40, 50, 60, 90 min 取 20 μ L 样品终止反应,用 SDS-PAGE 检测胰酶对 Hsp16.3 蛋白的消化情况。

2 结果

2.1 N 端区或 C 端区缺失的两个 Hsp16.3 残体蛋白表达载体的构建

按照 Hsp16.3 与 Hsp16.5 的序列比对结果、Hsp16.5 在晶体结构中的二级结构特征^[11]以及 de Jong 对小分子热休克蛋白家族 α -crystallin 域的定义^[12](图 1(a)),我们定义了 Hsp16.3 的 N 端区, α -crystallin 域和 C 端区。与 de Jong 的定义相比,我们定义的 Hsp16.3 的 α -crystallin 域包含了与 Hsp16.5 的 β 1 和 α 2 同源的区域。这两段区域的加入主要是由于从 Hsp16.5 的晶体结构上看,它们应该是其 α -crystallin 域不可分割的部分。基于这个定义, N 端区或 C 端区缺失的 Hsp16.3 残体蛋白如图 1(b)所示。利用材料与方法中设计的两套引物,我们通过 PCR、酶切和连接反应将这两个残体蛋白基因构建到了 P13 表达载体上,经酶切鉴定,得到了其阳性克隆(虽然 Hsp16.3 的基因编码 144 个氨基酸,但是由于重组表达的 Hsp16.3 的 N 末端甲硫氨酸丢失^[7],我们的比对和设计以 143 个氨基酸为准)。

2.2 Hsp16.3 残体蛋白的表达与纯化

把经双酶切鉴定的含两个残体基因片段的阳性克隆送博亚生物技术有限公司测序,证实目的序列完整正确且未出现氨基酸突变。在 37℃ 条件下,这两个带有残体基因片段的 P13 质粒在 *E. coli* BL21 (DE3) 里用 IPTG 诱导能进行可溶性表达。通过非变性条件下 Ni-NTA 亲和层析纯化,可得到纯度在 90% 以上的两个残体蛋白(图 2)。

2.3 野生型与残体蛋白的远紫外圆二色谱分析

为了确定 N 或 C 端区缺失是否会对 Hsp16.3 野生型蛋白的天然结构产生较大影响,我们利用远紫外圆二色谱的手段分析了这种末端缺失所带来的野生型蛋白二级结构的变化。从远紫外光谱上看,这两个末端缺失的残体蛋白与野生型蛋白的谱线在形状和大小上都吻合得很好,表现出该家族蛋白以 β -折叠构象为主的显著特征,在 217 nm 附近产生一个明显的特征负峰(图 3)。

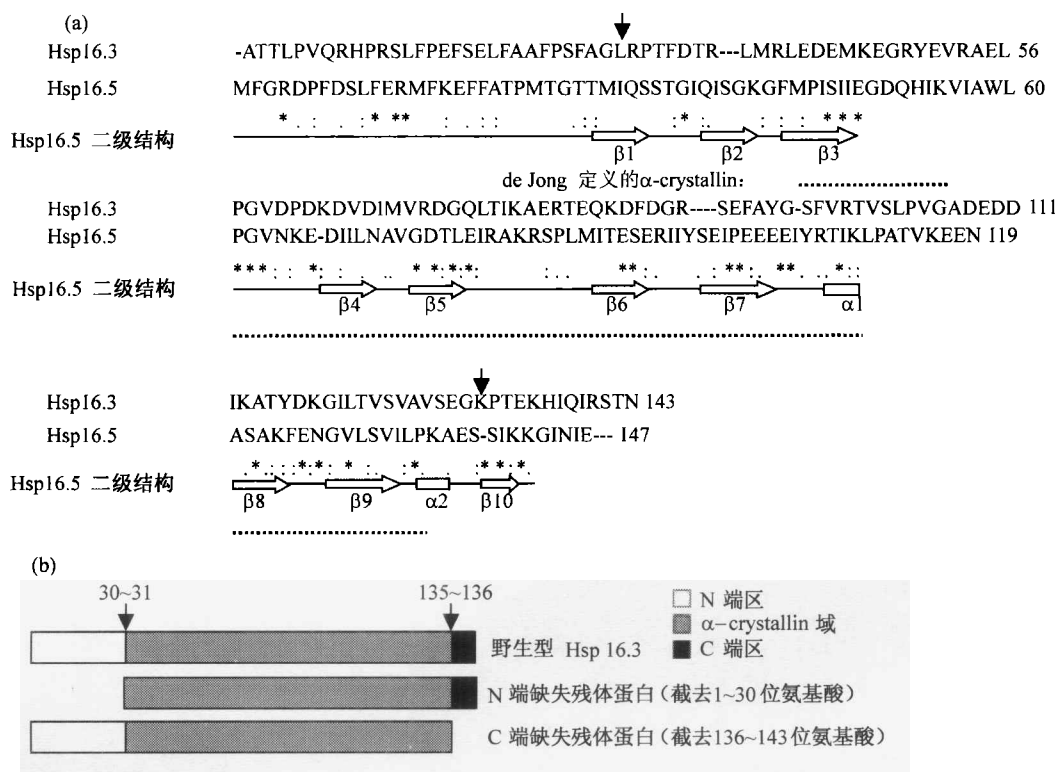


图1 Hsp16.3各功能区定义的依据及N端区或C端区缺失残体蛋白构建简图

(a) Hsp16.3与Hsp16.5的序列比对结果; (b) Hsp16.3的3个功能区划分及缺失残体蛋白构建

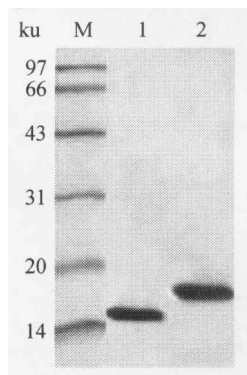


图2 两个Hsp16.3残体蛋白纯化结果

M, 蛋白分子量标准; 1, 经Ni-NTA柱纯化后N端区缺失Hsp16.3残体蛋白; 2, 经Ni-NTA柱纯化后C端区缺失Hsp16.3残体蛋白

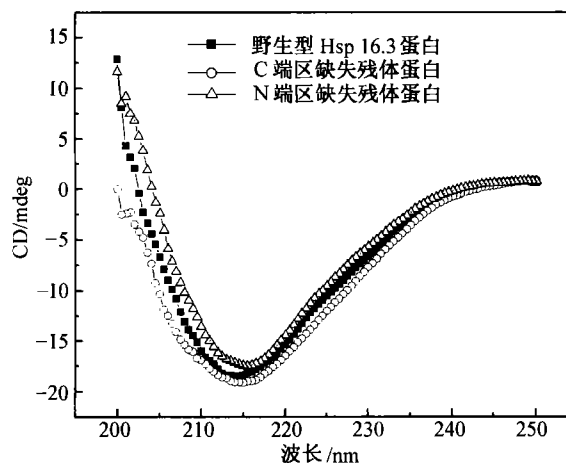


图3 野生型与两个残体蛋白的远紫外圆二色谱

2.4 野生型与残体蛋白的近紫外圆二色谱分析

当利用近紫外圆二色谱分析N或C端区缺失对Hsp16.3蛋白在三级结构上的影响时,这两个末端缺失残体蛋白的近紫外光谱与野生型蛋白的谱线也重叠得很好(图4)。这就说明Hsp16.3稳定的三级结构主要由于其序列中的近C端 α -crystallin域决定,N端区和C端区对这种结构的维持不起主要作用。

2.5 野生型蛋白与C端区缺失残体蛋白在重装配过程中形成同源寡聚体

小分子热休克蛋白家族成员的一个显著特征是形成寡聚体^[13]。过去的研究表明Hsp16.3在溶液中形成单分散相的九聚体装配结构^[7]。从该家族获得结构解析的两个其他蛋白来看,C端区是维持亚基之间相互作用的重要因素。为了了解Hsp16.3亚基

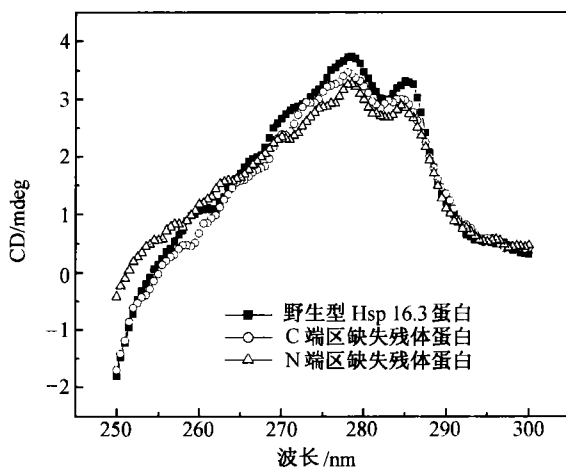


图4 野生型与两个残体蛋白的近紫外圆二色谱图

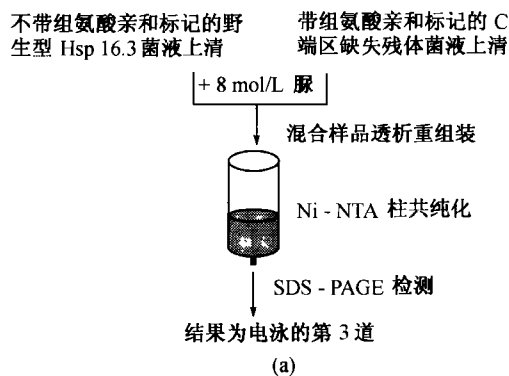
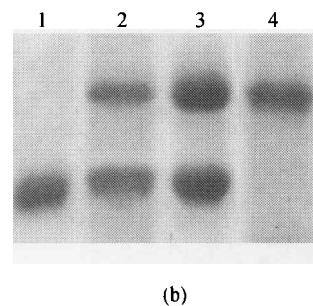


图5 野生型与C端区缺失残体蛋白在重组过程中的亚基交换

(a) 寡聚体亚基重组后共纯化的实验方法; (b) 野生型与C端区缺失残体蛋白经重组后共纯化的 SDS-PAGE 检测结果. 1, 不带组氨酸亲和标记的野生型 Hsp16.3 纯蛋白标准; 2, 野生型与C端区缺失残体蛋白在脲变性前的混合样; 3, 野生型与C端区缺失残体蛋白混合样在重装配后经 Ni-NTA 柱共纯化得到的样品; 4, 带组氨酸亲和标记的C端区缺失残体纯蛋白标准



2.6 野生型蛋白的胰酶消化

当用 SDS-PAGE 检测不同时间间隔胰酶对 Hsp16.3 野生型蛋白的消化时, 我们发现经过胰酶消化的 Hsp16.3 主要会释放出一条分子量比野生型蛋白稍小的蛋白(图 6). 从分子量上的差异来看, 胰酶作用的位点只能位于 Hsp16.3 的末端区域. 这

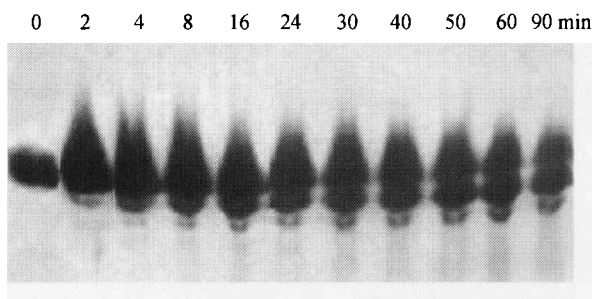


图6 野生型蛋白的胰酶消化图谱

是因为如果胰酶是作用于 α -crystallin 域内部的赖氨酸和精氨酸时, 释放片段的大小从序列上分析应与野生型蛋白差异较大(序列分析可参看图 1(a)). 通过这个结果, 我们可以推断 Hsp16.3 的 α -crystallin 域是相对稳定的, 它能抵抗胰酶的消化.

3 讨论

在结核杆菌潜伏期表达的一种小分子热休克蛋白 Hsp16.3 是研究小分子热休克蛋白家族功能及揭示结核菌在体内长期潜伏的致病机理的一个重要靶蛋白. 参照 de Jong 对小分子热休克蛋白 α -crystallin 域的定义^[11], 通过 Hsp16.3 与该家族获得晶体结构解析的 Hsp16.5 在序列及结构上的比较^[11], 我们定义了 Hsp16.3 的 3 个典型功能区: N 端疏水区, 近 C 端保守的 α -crystallin 域和长度较短的 C 端

非保守区(图1)。基于这种划分,我们在大肠杆菌中分别克隆,表达和纯化了N端区或C端区缺失的两个Hsp16.3残体蛋白,以便对其各功能区作用做进一步研究。在远紫外和近紫外圆二色谱分析中,N端区或C端区缺失的残体蛋白表现出与野生型蛋白相似的二级和三级结构。当参照Hsp16.5的结构进行分析时,我们可以看到Hsp16.5的N或C端区对其基本二、三级结构的维持也不起主要作用。一方面,其N端区柔性较大在晶体结构中不可见;另一方面,由一个较短的 β -折叠组成的C端延伸区独立于 α -crystallin域的反平行 β -片层结构,主要在空间上为亚基之间的装配提供一种作用力,而不是维持其基本的三级结构^[11]。在胰酶消化时,Hsp16.3的以 β -折叠为主的 α -crystallin域是相对稳定的,能抵抗胰酶的消化作用。关于小分子热休克蛋白 α -crystallin域的稳定性从Hsp16.5在晶体结构中该域形成致密的由 β -片层组成的球形结构也得到了证实^[11]。所有这些研究表明, α -crystallin域在稳定Hsp16.3蛋白的基本结构时扮演了一个相对独立的重要角色。

小分子热休克蛋白的一个重要特征是形成寡聚体^[13]。Chang等的研究曾表明,体外纯化的Hsp16.3蛋白通常由3个三聚体组装成稳定的九聚结构,并且这种九聚体在4 mol/L尿素或1 mol/L盐酸胍的条件下解聚成三聚体^[7]。关于这类蛋白的亚基装配,Koteiche等^[14]认为,小分子热休克蛋白在进化上保守的 α -crystallin域氨基酸序列包含了其形成基本装配单位(如二聚体或三聚体)的信息,而随后由基本装配单位形成最终寡聚结构的信息则可能与其序列末端的非保守区密切相关。当研究Hsp16.3蛋白与C端区缺失残体蛋白在重组过程中亚基交换时,我们发现野生型蛋白与C端区缺失残体在重组的过程中能发生相互作用形成异源寡聚体,这个结果表明在Hsp16.3重组初期亚基的相互作用应该不是主要取决于其C端区。而关于N端区和C端区在Hsp16.3寡聚装配及伴侣活性中的具体作用,还在进一步研究中。

致谢 感谢清华大学生物系昌增益教授及其研究小组提供的Hsp16.3野生型质粒和在实验过程中给予的帮助。

参 考 文 献

- 1 Kim R, et al. Small heat shock protein of *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(16): 9129
- 2 Haslbeck M. SHsps and their role in the chaperone network. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59(10): 1649
- 3 Arrigo A P. SHsp as novel regulators of programmed cell death and tumorigenicity. *Pathol Biol (Paris)*, 2000, 48(3): 280
- 4 Mehlen P, et al. Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNF α -induced cell death. *EMBO J*, 1996, 15(11): 2695
- 5 Gusev N B, et al. Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins. *Biochemistry (Mosc)*, 2002, 67(5): 511
- 6 van Montfort R L, et al. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat Struct Biol*, 2001, 8(12): 1025
- 7 Chang Z, et al. Mycobacterium tuberculosis 16-kDa antigen (Hsp16.3) functions as an oligomeric structure *in vitro* to suppress thermal aggregation. *J Biol Chem*, 1996, 271(12): 7218
- 8 Yuan Y, et al. Stationary phase-associated protein expression in Mycobacterium tuberculosis: Function of mycobacterial alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol*, 1996, 178: 4484
- 9 Yang H, et al. The Mycobacterium tuberculosis small heat shock protein Hsp16.3 exposes hydrophobic surfaces at mild conditions: Conformational flexibility and molecular chaperone activity. *Protein Sci*, 1999, 8(1): 174
- 10 Studer S, et al. Chaperone Activity and Homo- and Hetero-oligomer Formation of Bacterial Small Heat Shock Proteins. *J Biol Chem*, 2000, 275: 37212
- 11 Kyeong K K, et al. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature*, 1998, 394: 595
- 12 de Jong W W, et al. Genealogy of the alpha-crystallin—small heat-shock protein superfamily. *Int J Biol Macromol*, 1998, 22: 151
- 13 Lee G J, et al. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J*, 1997, 16(3): 659
- 14 Koteiche H A, et al. The determinants of the oligomeric structure in Hsp16.5 are encoded in the alpha-crystallin domain. *FEBS Lett*, 2002, 519(1-3): 16