

植物小分子热休克蛋白

余瑛* 夏玉先 蔡绍哲

(重庆大学生物工程学院生物力学与组织工程重点实验室 基因工程中心 重庆 400044)

摘要 在热刺激下,真核和原核细胞都能产生一类小分子热休克蛋白(small heat shock proteins, sHSPs),植物 sHSPs 数量、种类众多而且十分重要。目前已经发现植物中至少存在 6 种细胞内 sHSPs。植物在特定的发育阶段或受到逆境条件的刺激产生 sHSPs。大量研究表明 sHSPs 通过分子伴侣机制保护逆境中的细胞,在植物逆境忍耐中起着重要作用。

关键词 植物 小分子热休克蛋白 分子伴侣

在热刺激下,植物大量产生多种 sHSPs 可能是出于他们快速适应时常变化的环境条件(如温度,光照,湿度)的需要。根据 DNA 序列的相似性、免疫交叉反应和细胞内定位的情况,sHSPs 被分为 6 种。在正常的生长条件下植物组织中通常检测不到 sHSPs 的存在,但在逆境和特定的发育阶段却能检测到 sHSPs 的表达。由于 sHSPs 合成与逆境应答具有相关性,人们普遍认为 sHSPs 的作用在于保护逆境中的细胞,使其免受不利环境带来的伤害。大量研究表明 sHSPs 承担着分子伴侣的角色,可以与部分折叠或变性的底物蛋白结合以阻止不可逆转的分子聚集或帮助底物蛋白完成正确折叠。

1 植物 sHSPs 的种类及其结构

植物受到热刺激后产生的 sHSPs 分子量多为 15~42kDa。植物 sHSPs 都由核基因编码,可分为 6 种:3 种 sHSPs (CI, CII 和 CIII) 定位在细胞质或细胞核中,另外 3 种分别定位在质体(P)、内质网(ER)和线粒体(M)中。sHSPs CI 和 CII 一般由多基因家族编码。除了植物线粒体中的 HSP22 同时也存在于果蝇外,植物产生的其他 sHSPs 都仅存在于植物中。

不同植物的同种 sHSPs 在氨基酸组成上具有高度同源性。所有 sHSPs 的 C 端都有一个由 100 个氨基酸组成的保守区域,被称为 α -晶体蛋白域(α -crystallin domain, ACD)也叫热休克域^[1]。ACD

被一段长度可变的亲水片段分隔成 2 个区:共同序列和共同序列,二者形成 2 个反向平行的 α -折叠构成 α -三明治结构。共同序列 I 由保守的 Pro-X₍₁₄₎-Gly-Val-Leu 组成。不同种类的 sHSPs N 端差异很大,但同种胞质或核 sHSPs 有其特异的 N 端序列。细胞质 sHSPs CI 保守区位于 N 端 107~120 氨基酸位点,sHSPs CII 的 N 端保守区在 143~154 氨基酸位点^[2]。质体 sHSPs 的 N 端有一段富含甲硫氨酸的共同序列,它形成一个双亲的 α -螺旋结构,这一结构可能与底物结合有关^[3]。

所有植物 sHSPs 都有一个共同的特征即能自发地形成大小为 200~300kDa 的同源寡聚体,ACD 可能在寡聚体的形成中起作用。寡聚体的具体形成过程还不十分清楚,可能是首先形成小的寡聚体然后再组装成大的寡聚体复合体^[4]。sHSP 单体中至少有 2 个位点与寡聚体形成有关:一个位于 N 端,负责将 sHSP 单体组装成寡聚体;另一个位于 C 端,其作用是形成小分子寡聚体。寡聚体复合体的 N 端掩埋于复合体结构的内部,而 C 端则暴露在表面,形成一个各亚单位均匀分布的球状聚合体^[4]。sHSP 的 C 端可能有增加寡聚体的可溶性和稳定性的作用。Leroux 等研究发现:截短 sHSP 的 C 端后不影响其寡聚体的形成,但寡聚体的溶解性降低^[4]。

2 植物 sHSPs 的表达

2.1 逆境与植物 sHSPs 的表达

除热休克外其他非生物因素也可诱导 sHSPs 基因的表达和蛋白合成(表 1)。sHSPs 能对渗透压

收稿日期:2003-03-04 修回日期:2003-04-03

*电子信箱:xyyuying@sohu.com

的变化产生应答,在向日葵中水压变化引起 HaHSP17.6 (CI) 和 HaHSP17.9 (CII) 基因的表达,其 mRNA 表达水平与水分丧失程度呈正相关^[5]。向日葵应答产生的 sHSPs 可在有茎压和根压的组织中检测到。

胞质 sHSPs 在复苏植物车前草 (*C. plantagineum*) 中组成性表达,但其不耐干旱的愈伤组织里则没有表达。用外源脱落酸处理车前草后,其 sHSPs 大量增加^[6]。sHSPs 对干旱产生应答,表明 sHSPs 对于干旱耐受非常重要,而且其表达受到脱落酸相关机制的调节。

sHSPs CI、CII, 线粒体 sHSPs, 叶绿体 sHSPs 可以受氧压诱导产生。有的 sHSPs 也受寒冷、重金属、臭氧、紫外线等因素诱导^[7-9]。

2.2 植物发育阶段与 sHSPs 的表达

在没有环境压力的情况下,植物 sHSPs 的合成严格出现在某一特定的发育阶段,如胚胎发生、种子萌发、花粉发育及果实成熟期(表 1)。胚胎发生由 3 个主要阶段组成:早期阶段主要是细胞分化和伸长;中熟期,出现脱落酸高峰,种子进入休眠状态,水分逐渐减少;迟熟期,大量储藏蛋白和迟熟蛋白合成。成熟的种子能忍受大量失水与 sHSPs 的功能相关。黄杉胚胎从中熟期开始累积 AtHSP17.4-CI、AtHSP17.6-CI 和 AtHSP17.7-CII,到迟熟期胚胎和干种子中累积量达到高峰^[7,10]。sHSPs 在种子成熟过程中表达不断增加并发生累积的现象提示 sHSPs 可能有保护细胞组分,避免水分流失对细胞产生损伤的作用^[10]。有证据表明,抑制 sHSPs 表达,会导致胚胎发育失败^[11]。

表 1 发育阶段和非热环境因素与 sHSP 基因的表达

条件	植物种类	sHSP 基因
胚胎发育	向日葵 (<i>Helianthus annuus</i>)	HaHsp17.6-CI
	豌豆 (<i>Pisum sativum</i>)	PsHsp18.1-CI,PsHsp17.7-CII
	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	AtHsp17.4-CI, AtHsp17.6-CI,sp17.7-CII
	番茄 (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	与 LpHsp17.7-CI,LpHsp17.3-CII 同源
发芽	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	AtHsp17.4-CI, AtHsp17.6-CI,AtHsp17.7-CII, AtHsp17.6-CII
	黄杉 (<i>Pseudotsuga menziesii</i>)	DF4-5 (CI)
	大麦 (<i>Hordeum vulgare</i>)	HvHsp26.8-P, HvHsp26.9-P
体细胞胚胎发生	苜蓿 (<i>Medicago sativa</i>)	Hsp18.1 (CI),MsHsp18.2-CI
	烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	NtHsp18-CI
花粉发育	百合 (<i>Lilium</i>)	cDNAs 与 sHsp (CI) 同源
	玉米 (<i>Zea mays</i>)	ZmHsp17-CII HSP18
	烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	NtHsp18-CI
果实成熟	番茄 (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	与 LpHsp17.7-CI,LpHsp17.3-CII 同源,LeHsp23.8-P
	渗透压	
脱落酸	向日葵 (<i>Helianthus annuus</i>)	HaHsp17.6-CI,HaHsp17.9-CII
	车前草 (<i>Craterostigma plantagineum</i>)	与 HaHsp17.6-CI、HaHsp17.9-CII 同源
	橡树 (<i>Quercus suber</i>)	QsHsp17-CI
	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	AtHsp17.7-CII, AtHsp17.6-CII
氧压	向日葵 (<i>Helianthus annuus</i>)	HaHsp17.6-CI
	车前草 (<i>Craterostigma plantagineum</i>)	与 HaHsp17.6-CI、HaHsp17.9-CII 同源
	橡树 (<i>Quercus suber</i>)	QsHsp17-CI
	橡树 (<i>Quercus suber</i>)	QsHsp17-CI
低温	番茄 (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Hsp22 (M)
	欧芹 (<i>Petroselinum crispum</i>)	Hsp17.9 (CI)
	籼稻 (<i>Oryza sativa</i>)	OsHsp26.6-P
	黄杉 (<i>Pseudotsuga menziesii</i>)	AtHsp17.7-CII
重金属	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	CII9 (ER)
	番茄 (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	TOM66 (CI),TOM11 (P)/LeHsp23.8-P
	山桑 (<i>Morus bombycis</i>)	WAP20 (ER)
	欧洲栗 (<i>Castanea sativa</i>)	CsHsp17.5-CI
光周期	苜蓿 (<i>Medicago sativa</i>)	Hsp18.1 (CI),MsHsp18.2-CI
	黄杉 (<i>Pseudotsuga menziesii</i>)	AtHsp17.7-CII, AtHsp17.6-CIII
	裂叶牵牛 (<i>Pharbitis nil</i>)	sHsp-1 (CII)

2.3 热休克转录因子 (heat shock transcription factor, HSF) 调控 sHSPs 基因表达

HSF 通过高度保守的上游反应元件——热休克反应元件 (heat shock-responsive element, HSE) 调控 sHSPs 基因表达。HSE 由 3 个临近的反向重复序列 nGAAn 组成, 植物 HSE 序列为 5V-aGAAG-3V。在正常条件下 HSF 处于关闭状态, 但在热逆境下, HSF 形成三聚体并发生活化, 与 DNA 的亲合性增加, 暴露出转录活性域。HSE 的活性可能是通过与 HSF 结合实现的, HSE 突变会降低它与 HSF 的结合能力并影响随后的启动子活化^[12]。然而, 早期胚胎发育阶段 HSE 突变并不影响它与 HSF 的结合, 表明还有其他的种子特异转录活性因子参与调控过程。

3 植物 sHSPs 的分子伴侣功能

sHSPs 的产生和累积是对环境压力和发育刺激的应答, 与逆境耐受呈正相关。sHSPs 十分稳定, 热刺激解除后, 其半衰期为 30 ~ 50h, 表明 sHSPs 可能对于植物的重新修复很重要。

sHSPs 不仅有抑制细胞凋亡、促进细胞骨架形成等功能, 还有保护电子传递链^[13] (线粒体 sHSPs) 和光系统的电子传递 (叶绿体 sHSPs)^[14] 等作用。如位于美洲土荆芥叶绿体内囊体腔的 22kDa HSP 被抗体中和后, 光系统的电子传递中断; 但加入外源的这种 HSP 后, 光系统的热稳定性增加, 受到热刺激后, 光系统的电子传递仍能完整而正常地进行。但叶绿体 sHSPs 不能修复已经发生热变性的光系统^[15]。此外 sHSPs 可能还有其他功能, 如 DcHSP17.7-CI 参与热休克后的转录调控^[16] 等。

尽管 sHSPs 的功能多样, 但这些功能都是建立在其分子伴侣活性的基础之上。sHSPs 能与非本土蛋白结合形成寡聚体, 这正是典型的分子伴侣具有的特征。目前关于 sHSPs 功能的模型认为 sHSPs 能与非本土的蛋白选择性结合, 抑制其聚集, 并维持其所具有的感受态, 使其能在别的分子伴侣帮助下完成依赖于 ATP 的折叠^[17]。sHSPs 的分子伴侣活性与 ATP 无关, 而大分子热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 如 HSP70 和 HSP40 的功能需要依赖于 ATP。细胞质 sHSPs 与 HSPs 协同作用, 可形成分子量达 1 ~ 2MDa, 直径约 40 nm 的高分子聚合物—热休克颗粒 (heat stress granules, HSGs)。据推测 HSGs 是热诱导后, 未折叠的蛋白与 sHSP 寡聚体结合并在细胞质中发生累积的结果。HSGs 主要含有

胞质 sHSPs CI、CII, HSP70 和热转录因子 (heat stress transcription factor, HsfA2) 等^[18,19]。Nover 等认为 HSGs 的形成分为 3 步^[18]: 2 个单体 sHSPs 通过 ACD 作用形成 sHSPs CI 同源二聚体; sHSPs CI、CII 整合形成高度有序的寡聚体; sHSPs CI、CII 与热休克应答的其他组分共同形成 HSGs 复合体。sHSPs CI、CII 可能为未完成折叠的蛋白提供了结合表面, 使其能在 HSP70 或 HSP40 的帮助下, 重新完成折叠^[19]。

热休克诱导后, 形成 HSGs 的现象已经在多种植物细胞包括胚胎和花粉中观察到。关于 HSGs 的功能目前还不清楚, Nover 等认为它可能是逆境条件下储藏看家基因 mRNPs 和 HsfA2 的场所, 在逆境解除后 HSGs 发生解体, 释放出看家基因的 mRNAs 并被细胞迅速利用。但这一推断尚有争论。

4 结论与展望

植物 sHSPs 是一类在逆境条件和特定发育阶段表达的小分子蛋白, 在植物逆境忍耐、胚胎发育和果实成熟中有着重要作用。sHSPs 通过分子伴侣机制与其它分子协同作用帮助未折叠的蛋白重新折叠, 保护叶绿体的光系统 II 和线粒体的电子传递链, 参与热休克后的转录调控, 对逆境中的细胞起着保护作用。尽管已有研究发现 sHSPs 参与了 HSGs 结构的形成, 但 HSGs 的结构与功能关系及其在热休克应答和修复中的作用机理还不清楚, Nover 的假说仍需要更多的证据予以证实。目前关于 sHSPs 研究和认识还处于初步阶段, 仍有待进一步完善。

参考文献

- [1] Scharf K D, Siddique M, Vierling E. The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains (Acd proteins). *Cell Stress Chaperones*, 2001, 6(3): 225 ~ 237
- [2] Lenne C, Block M A, Garin J, et al. Sequence and expression of the mRNA encoding HSP22, the mitochondrial small heat-shock protein in pea leaves. *Biochem J*, 1995, 311 (3): 805 ~ 813
- [3] Gustavsson N, Håindahl U, Emanuelsson A, et al. Methionine sulfoxidation of the chloroplast small heat shock protein and conformational changes in the oligomer. *Protein Sci*, 1999, 8(11): 2506 ~ 2512
- [4] Leroux MR, Melki R, Gordon B, et al. Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with

- unfolded polypeptides. J Biol Chem, 1997, 272 (39) : 24646 ~ 24656
- [5] Coca M A, Almoguera C, Thomas T L, et al. Differential regulation of small heat-shock genes in plants: analysis of a water-stress-inducible and developmentally activated sunflower promoter. Plant Mol Biol, 1996, 31 (4) : 863 ~ 876
- [6] Alanillo J, Almoguera C, Bartels D, et al. Constitutive expression of small heat shock proteins in vegetative tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. Plant Mol Biol, 1995, 29 (5) : 1093 ~ 1099
- [7] Sun W, Bernard C, Cotte B, et al. At-HSP17. 6A, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression. Plant J, 2001, 27 (5) : 407 ~ 415
- [8] Banzet N, Richaud C, Deveaux Y, et al. Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. Plant J, 1998, 13 (4) : 519 ~ 527
- [9] Lee GJ, Vierling E. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. Plant Physiol, 2000, 122 (1) : 189 ~ 198
- [10] Wehmeyer N, Hernandez L D, Finkelstein R R, et al. Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. Plant Physiol, 1996, 112 (2) : 747 ~ 757
- [11] Wehmeyer N, Vierling E. The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. Plant Physiol, 2000, 122 (4) : 1099 ~ 1108
- [12] Almoguera C, Prieto-Dapena P, Jordano J. Dual regulation of a heat shock promoter during embryogenesis: stage-dependent role of heat shock elements. Plant J, 1998, 13 (4) : 437 ~ 446
- [13] Low D, Brandle K, Nover L, et al. Cytosolic heat-stress proteins Hsp17. 7 class I and Hsp17. 3 class II of tomato act as molecular chaperones in vivo. Planta, 2000, 211 (4) : 575 ~ 582
- [14] Downs C A, Heckathorn S A. The mitochondrial small heat-shock protein protects NADH: ubiquinone oxidoreductase of the electron transport chain during heat stress in plants. FEBS Lett, 1998, 430 (3) : 246 ~ 250
- [15] Heckathorn S A, Downs C A, Sharkey T D, et al. The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress. Plant Physiol, 1998, 116 (1) : 439 ~ 444
- [16] Malik M K, Slovin J P, Hwang C H, et al. Modified expression of a carrot small heat shock protein gene, hsp17. 7, results in increased or decreased thermotolerance double dagger. Plant J, 1999, 20 (1) : 89 ~ 99
- [17] Waters E R, Lee GJ, Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. J Exp Bot, 1996, 47 (296) : 325 ~ 338
- [18] Nover L, Scharf K D, Neumann D. Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. Mol Cell Biol, 1983, 3 (9) : 1648 ~ 1655
- [19] Scharf K D, Heider H, Hohfeld I, et al. The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. Mol Cell Biol, 1998, 18 (4) : 2240 ~ 2251

The Progress in Small Heat Shock Proteins

Yu Ying Xia Yuxian Cai Shaoxi

(Bioengineering College at Chongqing University, Key Laboratory for Biomechanics and Tissue Engineering under Ministry of Education, Genetic Engineering Center at Chongqing University Chongqing 400044)

Abstract Small heat shock proteins (sHSPs) are produced ubiquitously in prokaryotic and eukaryotic cells upon heat. sHSPs in plants is specially importance because of its unusual abundance and diversity. Six classes of sHSPs have been identified in plants. In addition to heat stress, plant sHSPs are also produced under other stress conditions and at certain developmental stages. sHSPs protect cells from the detrimental and play an important role in stress tolerance.

Key words Plant sHSPs Molecular chaperone