

腾冲嗜酸热两面菌伴侣素 ATcpn β 底物结合特性研究

王丽¹⁾ 张凯²⁾ 樊峥¹⁾ 董志扬^{1)**} 孙飞^{2)**}

¹⁾中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101;

²⁾中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 嗜酸嗜热古菌腾冲嗜酸热两面菌(*Acidianus tengchongensis*)来源的 II 型伴侣素 ATcpn β 已获得晶体结构解析, 其顶端结构域突触下端相应于 I 型伴侣素 GroEL 的重要底物结合位点处的氨基酸多为极性氨基酸, 将其突变为疏水性氨基酸时, 突变体对变性底物的捕获能力显著增强. 表面等离子共振研究表明, ATcpn β 对于化学变性底物的再折叠中间体的其捕获作用不依赖于 Mg²⁺/ATP. 前期对该伴侣素冷冻电镜观察和结构解析表明, ATP 的存在并不能驱动 ATcpn β 从开放构型向闭合构型转变, 但是表面等离子共振研究表明, ATcpn β 对热变性过程中已经聚集的底物的捕获作用依赖于 Mg²⁺/ATP, 说明 Mg²⁺/ATP 可以介导 ATcpn β 顶端结构域一定的构象变化, 引起顶端结构域疏水残基的进一步暴露, 从而能够与高分子聚集体紧密结合. 两个方面的研究均表明, 伴侣素蛋白与变性底物的结合仍然以疏水相互作用为主, 并且伴侣素蛋白与变性底物的结合受 Mg²⁺/ATP 的结合调控, 与伴侣素蛋白疏水面的暴露程度相关.

关键词 嗜酸嗜热古菌, 伴侣素 (chaperonin), 蛋白质折叠, 表面等离子共振

学科分类号 Q518.4

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00504

伴侣素 HSP60(chaperonin)是通过水解 ATP 帮助蛋白质折叠的多亚基双环复合物^[1]. 根据其结构特点和序列同源性将其分为两个亚型(I 型和 II 型)^[2]. I 型伴侣素来源于真细菌^[3]、线粒体和叶绿体^[4], II 型伴侣素来源于古菌(thermosome)^[5]和真核细胞的细胞质(CCT/TRiC)^[6-7]. 在古菌中的 II 型伴侣素由于其较高的温度耐受性和热诱导性, 又被称为热源体(thermosome).

I 型伴侣素尤其是来自于 *E. coli* 中的伴侣素分子 GroEL, 其底物结合特性被研究得比较透彻, 结构和功能实验均表明, 底物结合的疏水表面位于 GroEL 赤道结构域面向中央空腔的两个 α 螺旋 H 和 L 处^[8-11]. 决定底物亲和力的关键氨基酸绝大部分为疏水性氨基酸^[8]. 冷冻电镜的高分辨率结构解析表明, GroEL 的至少三个相邻的有功能活性的顶端结构域, 对核酮糖 -1, 5- 二磷酸羧化酶 / 加氧酶 (Rubisco) 或猪心线粒体苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase, MDH) 折叠是必需的^[12-13]. 此外, 在麦芽糖结合蛋白的双突变体(DM-MBP)与 GroEL

结合后与 ATP 进一步结合的过程中底物会发生一定程度的去折叠变化以释放更多的疏水区域, 从而与 GroEL 形成更紧密的结合^[14].

与 GroEL 需要辅分子伴侣 GroES 来关闭腔体完成促折叠循环不同, II 型伴侣素依靠顶端结构域上的突触来关闭中央空腔, 并进一步完成促进底物折叠的作用. 目前古菌伴侣素蛋白的天然底物尚不确定, 且其底物结合位点也不清楚^[15], 有研究表明, 对于 *Thermoplasma acidophilum* 的伴侣素多聚体来说, 其底物结合区域一个位于顶端突触, 一个位于顶端突触的下端^[16-17]. Iizuka 等^[18]对 *Thermococcus*

* 国家自然科学基金 (30770496), 国家高技术研究发展计划 (863) (2007AA100604) 和国家重点基础研究发展计划 (973) (2006CB503910, 2006CB806506) 资助项目.

** 通讯联系人.

董志扬. Tel: 010-64807331, E-mail: dongzy@mail.im.ac.cn

孙飞. Tel: 010-64888582, E-mail: feisun@ibp.ac.cn

收稿日期: 2010-09-28, 接受日期: 2010-11-23

KS-1 的 α 亚基顶端突触的全部和部分截短突变体的研究表明, 顶端突触对于伴侣素结合热变性的柠檬酸盐合酶和酸变性的绿色荧光蛋白不是必需的, 但对于伴侣素蛋白完成 ATP 依赖的促蛋白折叠循环过程是必需的. II 型伴侣素与底物的结合是否完全依赖 ATP 以及是以疏水性氨基酸为主还是存在极性相互作用, 目前还是未知的.

本研究通过将我们先前解析的古菌 *Acidianus tengchongensis* 来源的伴侣素蛋白 ATcpn β 的晶体结构^[9]与 GroEL 晶体结构进行比较, 将其相应于 GroEL 底物结合位置处的氨基酸突变为疏水性氨基酸, 发现突变体蛋白体外结合酸变性绿色荧光蛋白 (GFP) 和热变性柠檬酸盐合酶 (citrate synthase, CS) 的能力增强. 进一步通过表面等离子共振实验发现, 该伴侣素蛋白对不同变性底物结合过程对于 Mg²⁺/ATP 的依赖性有所不同, 这一现象表明该类古菌伴侣素蛋白对于不同变性程度的蛋白质中间体可能存在不同的结合特性: ATP 的存在对于伴侣素分子结合化学变性下可逆复性的折叠中间体不是必需的, 但是对于伴侣素分子结合热变性的聚集体是必需的.

1 材料和方法

1.1 材料

增强型绿色荧光蛋白 EGFP 的表达质粒由中国科学院生物物理研究所杭海英老师惠赠; 鸡卵清溶菌酶 (lysozyme)、猪心线粒体柠檬酸盐合酶 (CS, EC 2.3.3.1) 和来自于黄色栖热菌 *Thermus flavus* 的嗜嗜苹果酸脱氢酶 (MDH) 购自 Sigma 公司.

表面等离子共振实验的材料包括: 氨基偶联试剂盒 (Amine Coupling Kit, Biacore AB), 缓冲液 HBS-EP (10 mmol/L HEPES pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 3 mmol/L EDTA, 0.05% Tween 20) 和 CM5 传感芯片 (sensor chip CM5, Biacore AB), 所有溶液均用去离子水配制, 用 0.22 μ m 滤膜过滤, 使用前超声除气; 表面等离子共振检测所用的仪器为 Biacore X Biosensor System (Biacore AB).

1.2 实验方法

1.2.1 古菌伴侣素蛋白的重组表达、纯化和体外组装. 含有伴侣素基因 ATcpn β -pET23b 的质粒转入 *E. coli* Rosetta-gamiTM B(DE3) pLysS 菌株中进行重组表达. 对细胞粗提物进行 75 $^{\circ}$ C 热处理 30 min 收集上清, 之后利用 Resource Q (GE Healthcare) 离子交换层析分离得到单体, 单体在 20 mmol/L

Tris-HCl, pH 7.4, 5 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L ATP 存在下 37 $^{\circ}$ C 温育 5 h 获得聚合体——即伴侣素. 聚合体通过 Superdex 200 (GE Healthcare) 分子筛层析进行纯化, 缓冲液为 50 mmol/L Tris-HCl, 25 mmol/L MgCl₂, 100 mmol/L KCl, 含有多聚体的组分通过超滤管 (Millipore, Amicon Ultra, MWCO 30 ku) 进行浓缩^[20].

1.2.2 顶端结构域特定氨基酸位点的突变体构建. 通过重叠延伸 PCR 构建位点特异性突变体, 获得双突变体 ATcpn β -m1 (G236Y/M237F), ATcpn β -m2 (D288L/A295V), 单突变体 ATcpn β -m3 (D288L) 以及 ATcpn β -m4 (A313V/K314V), 突变体基因分别构建到 pET23b 表达载体中在 *E. coli* Rosetta-gamiTM B (DE3) pLysS 菌株中重组表达. 纯化方法同上.

1.2.3 伴侣素蛋白抑制酸变性绿色荧光蛋白 (GFP) 复性的实验. 10 μ mol/L 增强型绿色荧光蛋白 EGFP 在 20 mmol/L Tris-HCl, 0.125 mol/L HCl, 0.3 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT 缓冲液中 25 $^{\circ}$ C 变性 1 h 以上, 之后稀释 100 倍, 稀释缓冲液为 25 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 0.3 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 稀释之后立即加入 0.1 μ mol/L 伴侣素蛋白及其突变体, 利用荧光分光光度计 FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH) 在 25 $^{\circ}$ C 下监测 30 min, 激发光波长 485 nm, 发射光波长 520 nm. 取等量的 0.1 μ mol/L 未变性绿色荧光蛋白的荧光值为 100% 进行数据归一化.

1.2.4 伴侣素蛋白抑制热变性柠檬酸盐合酶聚集的实验. 取 0.1 μ mol/L 猪心线粒体柠檬酸盐合酶 (CS) 在 45 $^{\circ}$ C 下温育 20 min, CS 发生热变性聚集. 在加热温育前加入等摩尔数的伴侣素蛋白能够抑制 CS 的热变性聚集. 通过荧光分光光度计 F-4500 (Hitachi, Japan) 测定光散射 (激发光和发射光波长均为 500 nm, 滤光波长宽度为 2.5 nm) 来检测 CS 的热变性聚集.

1.2.5 表面等离子共振法 (surface plasma resonance) 测定伴侣素蛋白与变性底物的结合实验. 将 CM5 传感芯片通道 1 设为对照通道, 25 $^{\circ}$ C 下保持恒定的流速, 使 HBS-EP 缓冲液连续流过芯片表面 5 min, 待基线平稳后分别进样一定体积的不同 pH 值 (3.6, 4.0, 4.5), 包含 ATcpn β (50 mg/L) 的醋酸钠 (10 mmol/L) 缓冲液, 通过传感图谱判断吸附情况选取合适的 pH 值, 采用氨基偶联法固定 ATcpn β 至芯片. 将 100 nmol/L 的 CS (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 在 45 $^{\circ}$ C 下温育 20 min 后, 12 000 r/min 离

心 5 min, 直接进样或者在进样前加入 ATP(2 mmol/L) 或 MgCl₂ (25 mmol/L) / ATP (2 mmol/L), 分别检测 ATcnp β 对其结合信号, 监测 120 s 后, 用缓冲液 50 mmol/L Tris-HCl pH7.4, 10 mmol/L MgCl₂, 100 mmol/L KCl 或 50 mmol/L NaOH 洗脱. 测定通道的 RU 值减去空白对照通道 1 的 RU 值(非特异性相互作用)即为待测样品的信号. 100 nmol/L 溶菌酶 (lysozyme) 在 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 105°C 下处理 15 min, 重复上述实验. 20 μ mol/L 苹果酸脱氢酶 (MDH) 在 6 mol/L 盐酸胍下变性 1 h 以上, 100 倍稀释复性后, 重复上述实验.

2 结 果

2.1 结构比对和定点突变研究揭示古菌伴侣素 ATcnp β 结合底物的相关氨基酸残基

对 GroEL 中与底物分子结合相关的关键氨基酸进行突变——199Y/E、203Y/E、204F/E(图 1a 或 b 蓝色)、234L/E(图 1a 或 b 红色)、237L/E、259L/S、

263V/S、264V/S(图 1a 或 b 绿色), 会导致 GroEL 丧失与盐酸胍变性的人源鸟氨酸氨甲酰基转移酶相结合的能力^[8]. 我们之前解析了古菌伴侣素蛋白 ATcnp β 的晶体结构^[9], 通过比较 GroEL 与该伴侣素蛋白顶端结构域的序列和结构, 相对于 GroEL 中与底物分子结合的关键氨基酸位置, ATcnp β 多为极性或中性氨基酸 G236/M237(图 1c 蓝色)、D288(图 1c 红色)、A313/K314(图 1c 绿色), 这几个氨基酸处于顶端结构域的突触末端, 恰位于顶端结构域环内间隙处, 这些氨基酸残基与其周围保守疏水残基^[9]很可能与变性底物结合并介导其进入中央空腔有关. 为检测这些氨基酸的极性对其底物亲和力的影响, 我们对其进行了突变研究——将极性或中性氨基酸突变疏水性氨基酸, 构建了 ATcnp β -m1 (G236Y/M237F), ATcnp β -m2 (D288L/A295V), ATcnp β -m3(D288L)和 ATcnp β -m4 (A313V/K314V) 4 种突变体.

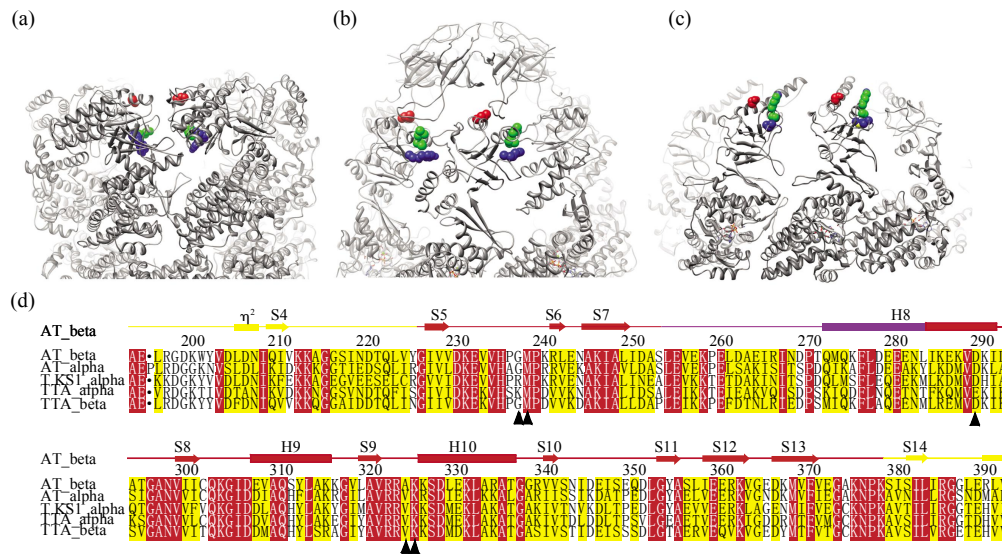


Fig. 1 Dominant residues relevant to peptide-binding ability in the apical domain of GroEL and thermosome ATcnp β

(a) Key residues of peptide-binding site in apo-GroEL shown in the trans-ring of GroEL-GroES₇-ADP₇ crystal structure. (b) Key residues of peptide-binding site in GroEL-(GroES)₇-(ADP)₇ complex shown in the cis-ring of GroEL-(GroES)₇-(ADP)₇ crystal structure. In (a) and (b), residues 203Y and 204F are colored in blue, 234L in red, and 237 L and 263V in green. (c) Corresponding residues of the superposed peptide-binding sites from the ATcnp β crystal structure. Residues G236 and M237 are colored in blue, D288L in red, and A313 and K314 in green. (d) Sequence alignment of the apical domains among several thermosomes (AT: *Acidianus tengchongensis*, T. KS1: *Thermococcus KS-1*, TTA: *Thermoplasma acidophilum*). Blank triangles point to the residues which we suggest as the key residues for substrate binding above.

2.2 ATcnp β 顶端结构域突触末端的疏水性增强能够促进其捕获酸性 GFP 的能力

GFP 在 0.125 mol/L 盐酸中变性(pH < 1.5), 去折叠为完全舒展的肽链, 其荧光立刻消失. 当稀释

100 倍恢复中性 pH 值后, GFP 迅速自复性, 25°C 下自复性率比较高, 能在 5 min 以内达到天然态荧光强度的 50%. 当伴侣素蛋白以等摩尔比例加入后, 野生型蛋白略微抑制 GFP 的自复性, 复性率

降低为天然蛋白的 40%~45%，表明伴侣素蛋白能够捕获酸变性的 GFP，从而抑制了其自复性。当将 ATcnp β 的 4 种突变体蛋白以相同的摩尔比加入复性体系后，GFP 自复性率进一步降低，ATcnp β -m1、ATcnp β -m2、ATcnp β -m3 和 ATcnp β -m4 分别降为

20%、30%、35%和 30%，这表明突变体蛋白对 GFP 的捕获作用相比野生型有显著增强(图 2a)。此外，对于结合作用最强的突变体 ATcnp β -m1 来说，这种增强作用在 45℃ 下也非常明显(图 2b)。

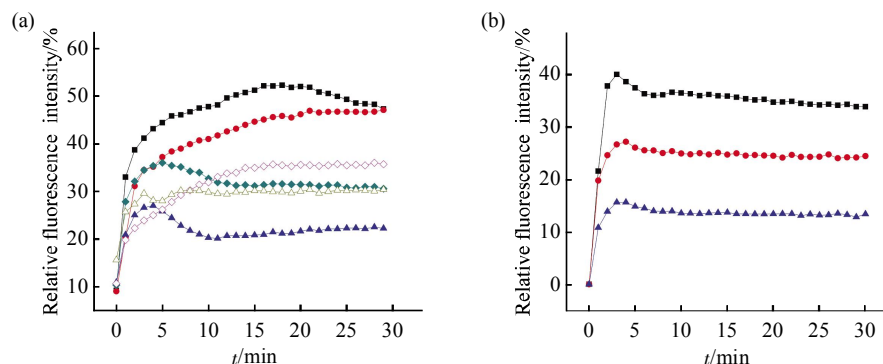


Fig. 2 Hydrophobic residues enhanced the inhibitory effect of ATcnp β on the refolding of acid-denatured GFP

(a) Refolding of acid-denatured GFP at 25°C. GFP (10 μ mol/L) was denatured in 0.125 mol/L HCl and then diluted 100-fold in the buffer, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 5 mmol/L MgCl₂, 0.1 μ mol/L thermosome or mutants were added separately. Closed squares stand for spontaneous refolding of GFP, closed circles stand for the inhibitory effect of wild-type ATcnp β , closed triangles for ATcnp β -m1, closed diamonds of ATcnp β -m2, open diamonds for ATcnp β -m3 and open triangles for ATcnp β -m4. ■—■: dGFP 25°C; ●—●: ATcnp β -wt; ▲—▲: ATcnp β -m1; ◆—◆: ATcnp β -m2; ◇—◇: ATcnp β -m3; △—△: ATcnp β -m4. (b) Refolding of acid-denatured GFP at 45°C. Closed squares stand for spontaneous refolding of GFP, closed circles for the inhibitory effect of wild-type ATcnp β , and closed triangles for ATcnp β -m1. ■—■: dGFP 45°C; ●—●: ATcnp β -wt; ▲—▲: ATcnp β -m1. All data in this figure were averaged from three independent experiments.

2.3 ATcnp β 顶端结构域突触末端的疏水性增强能够提高其抑制柠檬酸盐合酶的热变性聚集的能力

伴侣素蛋白在体外与变性底物的结合另一个显著的证据是它们能够捕获热变性中间体，抑制底物蛋白热变性过程中大分子聚集体的产生。猪心线粒体柠檬酸盐合酶 (CS) 在 45℃ 下会发生热变性，分子间相互聚集(尚未产生不溶沉淀)，能够引起 500 nm 处的光散射增强。当以等摩尔比例(聚合物与底物单体摩尔量相当)加入伴侣素蛋白 ATcnp β 后，CS 的聚集被完全抑制(图 3)。当加入 1/5 分子比例的野生型伴侣素蛋白，CS 的热变性聚集体的产生被部分抑制；而加入相同量的突变体蛋白后，其抑制作用相对于野生型蛋白有所增强(图 3)。100 nmol/L CS 在 45℃ 下加热 30 min 后，以其 500 nm 处的光散射值为 100%，伴侣素 100 nmol/L ATcnp β 加入体系后可以将聚集抑制到 16.6%，20 nmol/L ATcnp β 光散射值为 85.2%，而 3 种疏水性增强的突变体分别是 ATcnp β -m1 59.7%，ATcnp β -m2 64.2%，ATcnp β -m3 68.3%。以上实验表明，顶端结构域突触末端的疏水性增强能够促进其对热变性底物中间体的捕获，从而使得伴侣素分

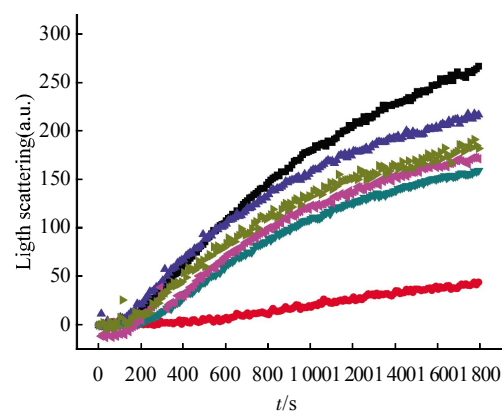


Fig. 3 Hydrophobicity enhanced the inhibition activity of citrate synthase (CS) thermal aggregation at 45°C

CS (100 nmol/L) was thermal aggregated (black line); Wild-type thermosome ATcnp β (100 nmol/L) was added (red line); Wild-type thermosome ATcnp β (20 nmol/L) was added (blue line); ATcnp β -m1 (20 nmol/L) was added (green line); ATcnp β -m2 (20 nmol/L) was added (purple line); ATcnp β -m3 (20 nmol/L) was added (yellow line). ■: CS 45°C; ●: ATcnp β -wt 100 nmol/L; ▲: ATcnp β -wt 20 nmol/L; ▼: ATcnp β -m1 20 nmol/L; ◆: ATcnp β -m2 20 nmol/L; ►: ATcnp β -m3 20 nmol/L. All data in this figure were averaged from three independent experiments.

子对变性分子间的相互聚集的抑制作用增强. 这一点进一步可以被表面等离子共振实验所证明——突变体 ATcnp β -m3 对热变性的柠檬酸盐合酶和溶菌酶的亲和力相对于野生型蛋白有所增强.

2.4 ATcnp β 与热变性聚集底物的结合呈现 Mg²⁺/ATP 依赖性

将伴侣素蛋白耦联到芯片后, 以天然柠檬酸盐合酶(CS)或溶菌酶(lysozyme)为流动相进样时, 没有检测到表面等离子共振的信号, 表明 ATcnp β 与天然 CS 或 lysozyme 不发生结合. 在没有

Mg²⁺/ATP 存在情况下, 将底物分子的热变性聚集体进样时, 也不能检测到表面等离子共振的信号, 这表明在 Mg²⁺/ATP 不存在时, 伴侣素蛋白 ATcnp β 不能结合已经加热变性的底物(图 4); 然而将 Mg²⁺/ATP 与热变性底物分子共同进样时, 能够检测到逐步增强的表面等离子共振信号, 这表明 Mg²⁺/ATP 与伴侣素蛋白 ATcnp β 的结合导致其能够结合热变性的底物(图 4). 并且 Mg²⁺ 也是必需的, 在 ATP 单独存在时, ATcnp β 不能结合热变性底物(图 4a, 红色).

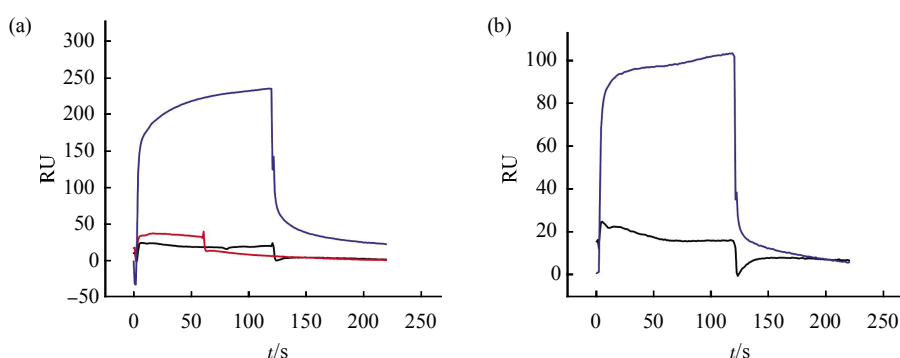


Fig. 4 Wild-type thermosome ATcnp β binds thermal aggregated citrate synthase (CS) and lysozyme in a Mg²⁺/ATP dependent manner

(a) After incubation at 45°C for 20 min, thermal aggregated CS with (blue line) or without Mg²⁺/ATP (red line) was added onto the CM5 chip fixed with thermosome ATcnp β . As a control, native CS alone was added onto the same chip separately as well (black line). —: ATcnp β +nCS; —: ATcnp β +dCS; —: ATcnp β +dCS+Mg²⁺/ATP. (b) After incubation at 105 °C for 15 min, thermal aggregated lysozyme with Mg²⁺/ATP (blue line) was added onto the CM5 chip that was fixed with thermosome ATcnp β . Native lysozyme alone was also added onto the chip separately as a control (black line). —: ATcnp β +nLzm; —: ATcnp β +dLzm+Mg²⁺/ATP.

2.5 ATcnp β 与化学变性蛋白折叠中间体的结合呈现 Mg²⁺/ATP 的不依赖性

嗜热细菌来源的苹果酸脱氢酶 (MDH) 其 T_m 达到 96°C, 70°C 加热 2 h, 酶活性没有丧失, 但在 6 mol/L 盐酸胍的存在下, 蛋白质解散为舒展的肽链, 酶活性完全丧失, 100 倍稀释使变性剂浓度降低后, 蛋白质快速复性, 复性率在 45°C 下可达到原来天然态活性的 50%. 在表面等离子共振实验中, 将变性 MDH 稀释 100 倍后迅速作为流动相进样, 检测芯片上的 ATcnp β 与变性底物的相互作用, 发现即使不存在 Mg²⁺/ATP 两者也有明显的结合信号, 这一现象表明, 古菌伴侣素蛋白 ATcnp β 对变性 MDH 有快速的结合(图 5), 而 Mg²⁺/ATP 的加入会进一步增强结合信号(图 5), 可见 Mg²⁺/ATP 所导致伴侣素蛋白 ATcnp β 的构象变化会进一步增强其与化学变性完全解散的肽链复性中间体的结合, 但 Mg²⁺/ATP 对 ATcnp β 捕获这类底物不是必需的.

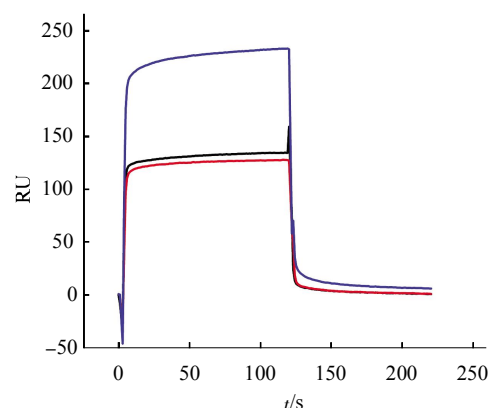


Fig. 5 Wild-type thermosome could bind guanidine hydrochloride denatured malate dehydrogenase (MDH) without Mg²⁺/ATP

MDH from *Thermus flavus* was denatured in 6 mol/L guanidine hydrochloride and then diluted 100 times to reduce guanidine hydrochloride. The diluted MDH without (black line) or with ATP alone (red line) or Mg²⁺/ATP (blue line) was separately added onto the chip fixed with thermosome ATcnp β . —: ATcnp β +dMDH; —: ATcnp β +dMDH+ATP; —: ATcnp β +dMDH+Mg²⁺/ATP.

3 讨 论

伴侣素蛋白对变性底物的结合、包裹和促折叠作用与伴侣素本身与 ATP 的结合和水解作用是相辅相成协同作用的。ATP 结合与水解所导致的伴侣素蛋白的构象变化是其完成促进变性蛋白折叠功能的必要条件。对于 I 型和 II 型伴侣素而言, 在促进蛋白质折叠的循环过程中, 究竟是先结合变性底物再结合核苷酸分子, 还是需要先与核苷酸分子结合才能结合底物, 目前还不清楚。本研究表明, 古菌来源的 II 型伴侣素 ATcnp β 与嗜热苹果酸脱氢酶复性中间体的结合不需要 Mg²⁺/ATP 的存在。对于热变性已经聚集但尚未沉淀的底物, 如加热变性聚集的柠檬酸盐合酶和溶菌酶, 伴侣素蛋白与之结合严格依赖 Mg²⁺/ATP, 并且 ATP 单独存在并不能引起伴侣素对变性肽链的结合, 只有 Mg²⁺/ATP 共同存在时才能与之结合。在 6 mol/L 盐酸胍作用下完全变性的嗜热苹果酸脱氢酶 (MDH) 在稀释除掉变性剂后能迅速形成二聚体, 从无活性的二聚体到有活性的二聚体是折叠的限速步骤^[1]。折叠中间体为绝大部分二级结构保留但是高级结构被扰动和破坏的分子。这一底物比热变性聚集体更接近于天然构象。在没有 Mg²⁺/ATP 的情况下, 该伴侣素 ATcnp β 本身所具有的疏水表面已经足够用于结合嗜热苹果酸脱氢酶的中间体, 而对于热变性聚集体, 需要更多的疏水表面和更大的开口才能够结合, 这就需要 Mg²⁺/ATP 的存在。

在前期工作中, 我们解析了该古菌伴侣素 ATcnp β 的晶体结构, 这是首个被解析的呈 9 次对称伴侣素分子的晶体结构, 而且是首个呈开放状态的晶体结构, 在该晶体结构中, 我们在顶端结构域突触部分发现了若干个保守的疏水残基, 推测其与底物结合有关系^[19]。将 II 型伴侣素 ATcnp β 的晶体结构与 I 型伴侣素 GroEL 晶体结构比对表明, 相应于 GroEL 中直接影响底物亲和力的关键疏水性残基, 在 ATcnp β 的对应位置多为极性氨基酸(在上述保守疏水残基的附近), 在本研究中, 我们将这些氨基酸突变为 GroEL 中对应的疏水性氨基酸, 发现其对变性底物的捕获能力进一步增强, 这表明 II 型伴侣素分子对底物的亲和力仍然依赖于疏水相互作用。

我们对该伴侣素分子 apo-ATcnp β 与 ATcnp β -ATP•AlF₃ 冷冻电镜观察和结构解析的研究结果表明, Mg²⁺/ATP 的结合不足以使该伴侣素分子

ATcnp β 从开放构型向闭合构型转变, 但在 Mg²⁺/ATP 结合后, 其顶端结构域和盖子结构域向外略微开放。即 Mg²⁺/ATP 结合导致该古菌伴侣素蛋白顶端结构域的外展, 开口变大, 并且疏水区域进一步暴露, 从而能够捕获热变性聚集体。尽管目前的分辨率还不足以给出 Mg²⁺/ATP 与 ATcnp β 结合所导致的开口变化的细节信息, 但是我们认为 ATP 结合调控伴侣素分子构象变化是增强 ATcnp β 的底物亲和力的重要因素。这一点与前期 Panson 等^[22]对 I 型伴侣素分子 ATP 结合导致结构变化的研究有相似之处, 该研究表明, GroEL 结合 ATP 后其中间结构域的旋转导致顺式环的顶端结构域向外延伸并逆时针旋转了 25°, 使得被掩埋的疏水残基得以暴露, 底物结合处开口变大。

综上所述, 我们根据实验数据得到如下结论: 首先, 古菌伴侣素分子与变性底物的结合作用与 I 型伴侣素类似, 伴侣素顶端结构域的疏水基团与变性底物暴露的疏水残基间的相互作用是最主要的相互作用; 其次, Mg²⁺/ATP 对伴侣素分子结合疏水面暴露程度不同的底物有调控作用, 并且这种调控所致的伴侣素顶端结构域疏水区域的变化是影响其底物亲和力的重要因素。

致谢 衷心感谢清华大学闫永彬教授、刘伟丰师兄以及本实验室的王沙同学在光散射测定实验方面的帮助。

参 考 文 献

- [1] Hemmingsen S M, Woolford C, van der Vies S M, *et al.* Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature*, 1988, **333**(6171): 330-334
- [2] Kim S, Willison K R, Horwich A L. Cytosolic chaperonin subunits have a conserved ATPase domain but diverged polypeptide-binding domains. *Trends Biochem Sci*, 1994, **19**(12): 543-548
- [3] Ranson N A, Clare D K, Farr G W, *et al.* Allosteric signaling of ATP hydrolysis in GroEL-GroES complexes. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, **13**(2): 147-152
- [4] Bukau B, Horwich A L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 1998, **92**(3): 351-366
- [5] Phipps B M, Hoffmann A, Stetter K O, *et al.* A novel ATPase complex selectively accumulated upon heat shock is a major cellular component of thermophilic archaeobacteria. *EMBO J*, 1991, **10**(7): 1711-1722
- [6] Gao Y, Thomas J O, Chow R L, *et al.* A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding. *Cell*, 1992, **69**(6): 1043-1050
- [7] Frydman J, Nimmegern E, Erdjument-Bromage H, *et al.* Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing

- TCP-1 and structurally related subunits. EMBO J, 1992, **11**(13): 4767-4778
- [8] Fenton W A, Kashi Y, Furtak K, *et al.* Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. Nature, 1994, **371**(6498): 614-619
- [9] Buckle A M, Zahn R, Fersht A R. A structural model for GroEL-polypeptide recognition. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, **94**(8): 3571-3575
- [10] Chen L, Sigler P B. The crystal structure of a GroEL/peptide complex: plasticity as a basis for substrate diversity. Cell, 1999, **99**(7): 757-768
- [11] Shewmaker F, Maskos K, Simmerling C, *et al.* The disordered mobile loop of GroES folds into a defined beta-hairpin upon binding GroEL. J Biol Chem, 2001, **276**(33): 31257-31264
- [12] Farr G W, Furtak K, Rowland M B, *et al.* Multivalent binding of nonnative substrate proteins by the chaperonin GroEL. Cell, 2000, **100**(5): 561-573
- [13] Elad N, Farr G W, Clare D K, *et al.* Topologies of a substrate protein bound to the chaperonin GroEL. Mol Cell, 2007, **26**(3): 415-426
- [14] Sharma S, Chakraborty K, Muller B K, *et al.* Monitoring protein conformation along the pathway of chaperonin-assisted folding. Cell, 2008, **133**(1): 142-153
- [15] Guagliardi A, Cerchia L, Rossi M. Prevention of *in vitro* protein thermal aggregation by the Sulfolobus solfataricus chaperonin. Evidence for nonequivalent binding surfaces on the chaperonin molecule. J Biol Chem, 1995, **270**(47): 28126-28132
- [16] Klumpp M, Baumeister W, Essen L O. Structure of the substrate binding domain of the thermosome, an archaeal group II chaperonin. Cell, 1997, **91**(2): 263-270
- [17] Bosch G, Baumeister W, Essen L O. Crystal structure of the beta-apical domain of the thermosome reveals structural plasticity in the protrusion region. J Mol Biol, 2000, **301**(1): 19-25
- [18] Iizuka R, So S, Inobe T, *et al.* Role of the helical protrusion in the conformational change and molecular chaperone activity of the archaeal group II chaperonin. J Biol Chem, 2004, **279**(18): 18834-18839
- [19] Huo Y, Hu Z, Zhang K, *et al.* Crystal structure of group II chaperonin in the open state. Structure, 2010, **18**(10): 1270-1279
- [20] Wang L, Hu Z J, Luo Y M, *et al.* Distinct symmetry and limited peptide refolding activity of the thermosomes from the acidothermophilic archaea Acidianus tengchongensis S5 (T). Biochem Biophys Res Commun, 2010, **393**(2): 228-234
- [21] Iijima S, Saiki T, Beppu T. Reversible denaturation of thermophilic malate dehydrogenase by guanidine hydrochloride and acid. J Biochem, 1984, **95**(5): 1273-1281
- [22] Ranson N A, Farr G W, Roseman A M, *et al.* ATP-bound states of GroEL captured by cryo-electron microscopy. Cell, 2001, **107**(7): 869-879

Substrate Binding Properties of Thermosome ATcpn β From *Acidianus Tengchongensis**

WANG Li¹⁾, ZHANG Kai²⁾, FAN Zheng¹⁾, DONG Zhi-Yang^{1)**}, SUN Fei^{2)**}

¹⁾The State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract The residues associated with substrate binding in Group I chaperonin GroEL are hydrophobic. However, the corresponding residues in group II chaperonin ATcpn β from *Acidianus tengchongensis* are hydrophilic. When these hydrophilic residues in ATcpn β were mutated to hydrophobic residues, i.e. residues 236 from G to Y, 237 from M to F, 288 from D to L, 295 from A to V, 313 from A to V and 314 from K to V, they enhanced the inhibitory effect of ATcpn β on the refolding of acid-denatured GFP and the inhibition activity of citrate synthase (CS) thermal aggregation. Hydrophobic interaction may contribute more to peptides binding affinity both in group I and group II chaperonin. Chaperonins have been proved to have ATP-dependent peptides refolding ability. However, it is still unclear whether peptides binding ability of chaperonins is ATP-dependent. Surface plasma resonance (SPR) analysis is used to test chaperonin binding ability to different peptides with different denaturing level. These assays revealed that ATcpn β could capture guanidine hydrochloride denatured malate dehydrogenase in a Mg²⁺/ATP independent manner while it bind thermal aggregated citrate synthase or lysozyme in a Mg²⁺/ATP dependent manner. It has been proposed that chaperonin conformational changes induced by Mg²⁺/ATP to expose more hydrophobic surface is required for chaperonin capturing thermal aggregated peptides which has larger hydrophobic surfaces.

Key words acidothermophilic archaea, chaperonin, protein folding, SPR

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00504

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30770496), Hi-Tech Research and Development Program of China (2007AA100604) and National Basic Research Program of China (2006CB503910, 2006CB806506).

**Corresponding author.

Dong Zhi-Yang. Tel: 86-10-64807331, E-mail: ongzy@mail.im.ac.cn

Sun Fei. Tel: 86-10-64888582, E-mail: feisun@ibp.ac.cn

Received: September 28, 2010 Accepted: November 23, 2010