

# 热激蛋白研究概况及其在海洋生物中的研究进展

## REVIEW ON HEAT SHOCK PROTEINS OF MARINE ORGANISM

孙旭彤 张士瑾 刘振辉 李红岩

(青岛海洋大学海洋生命学院 266003)

### 1 热激蛋白的发现及主要特性

自 20 世纪中叶第一次发现热激能诱导果蝇幼虫唾液腺染色体形成新的膨突后,进一步研究发现高温能使果蝇的蛋白质合成发生改变,正常的蛋白质合成被抑制,同时启动了一套新的蛋白质合成基因,新合成或增加合成一类应激蛋白,人们称这种反应为热激反应,由高温诱导合成的蛋白称为热激蛋白。以后研究逐渐发展到了昆虫、鸟类、哺乳动物、人类以及细菌、酵母等生物,发现从细菌到人类都具有合成热激蛋白的能力,因而认识到热激反应是一个普遍的生物现象<sup>[3]</sup>。热激蛋白最初被认为是生物体应答温度升高而表达的蛋白,但是有一些热激基因在无刺激的细胞中也有明显表达,或是在细胞周期的特定阶段产生,或是在生物体发育的某些阶段表达。另一重要的发现是:热激蛋白的许多成员也存在于线粒体和叶绿体中,所以热激基因实际上是一个并非所有成员都受热调控的多基因超级家族,热激基因家族中在无热激条件下也表达的成员通常被称为热激蛋白的同系蛋白(HSP Cognate, HSC)<sup>[1]</sup>。不同的物种及不同类型的细胞所产生的热激蛋白的种类与数量是各不相同的,但 70kDa 的热激蛋白(HSP70)在已研究过的动物、植物、微生物中普遍存在。研究表明 HSP70 具有高度的保守性,1986 年 Rochester 证明人类 HSP70 与大肠杆菌 HSP70 的氨基酸序列比较表明有 66% 的同源性。所有研究过的 HSP70 都能与 ATP 结合,并且有弱的 ATP 酶活性,能自身磷酸化。与 HSP70 相似, HSP90 也存在于所有已研究过的生物体内。热激蛋白在生物体内的普遍存在及高度保守性都预示着这类蛋白具有重要的、基本的生物学功能。

### 2 热激蛋白的分子伴侣功能及其在信号转导中的作用

蛋白质的折叠、组装是一个复杂的生物学过程,在这些生物学过程中,有一组蛋白,它们参与蛋白质的转运、折叠和组装,但本身不是蛋白质的最后结构

成分,这类蛋白被称为分子伴侣。1993 年 Georgopoulos 和 Welch<sup>[24]</sup> 证明已知的一些分子伴侣就是以前发现的热激蛋白,它们主要是 HSP70, HSP60 和 HSP90<sup>[4,5]</sup>。正是这种分子伴侣的功能使生物体产生的热激蛋白能阻止受热损伤的蛋白的聚集及帮助它们在热激或后复性<sup>[6]</sup>,所以热激蛋白在生物体耐热方面具有重要的功能。HSP70 是最重要的一类分子伴侣,在 ATP 存在条件下, HSP70 可以使变性的 RNA 聚合酶重新获得活性,使热失活的荧光素酶活性恢复 80%。线粒体内 HSP70 还能协助线粒体蛋白酶分解错误进入线粒体内的蛋白质。此外,蛋白质前体在从胞质转入线粒体的过程中,胞质 HSP70 和线粒体 mt-HSP70 是必不可少的,细胞信号转导过程也需要分子伴侣的参与。研究已经证明 HSP90、HSP70 等热激蛋白都参与了细胞内的信号转导。

细胞信号转导主要研究细胞感受、转导环境刺激的分子途径及其调控的基因表达和生理反应。最早人们发现 HSP90 与甾类激素介导的信号转导有关,1995 年 Bohren<sup>[25]</sup> 证明 HSP90 在调节甾类激素受体的构象中起了重要的作用, HSP90 与甾类激素受体结合后使受体处于准备与激素结合的构象状态,直到与激素结合后,引发受体激活,同时 HSP90 被受体释放出来。以后的许多实验又证明 HSP90 在促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号途径及不同的激素与生长因子介导的信号转导途径中都具有重要的功能<sup>[7,8]</sup>,最近, Kang<sup>[9]</sup> 又证明 HSP90 能调解糖皮质激素依赖的启动子的活性。HSP90 还能与蛋白激酶包括癌基因编码的酪氨酸激酶 P60v-src、酪氨酸激酶 II、蛋白激酶以及钙调素等重要的信号分子结合。所有这些都表明 HSP90 参与了多种信号转导途径。在甾类激素的信号转导过程中,除 HSP90 外, HSP70 和 YDJ1(酵母中 DnaJ 热激蛋白家族成员)的参与也是必需的。YDJ1 还能影响糖皮质激

第一作者:孙旭彤,出生于 1966 年,博士生。E-mail: sunxutong@163.net

收稿日期:2001-02-20;修回日期:2001-04-11

素受体、雌激素受体和酪氨酸激酶 P60vsrc 的功能。它们可能的作用是:当配体缺乏时,HSP70 和 YDJ1 蛋白协助组装和维持 aporeceptor 复合体的构象;当受体和配体结合后,HSP70 和 YDJ1 蛋白协助将 HSP90 从 aporeceptor 复合体中分离出来,以形成转录活性受体,为此,有人称 HSP90, HSP70, DnaJ 蛋白为信号伴侣。

钙离子在细胞功能调节上具有重要作用,钙调素是目前已知细胞内钙信号受体中最重要的一种,它参与了细胞分裂、分化、激素释放、糖原代谢等多种生理活动的调节<sup>[2]</sup>。近年来许多实验证明钙离子-钙调蛋白( $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ )信号途径也参与了热激反应。1986年,Stevenson<sup>[26]</sup>证明热激后能引起细胞内钙离子的增加;1990年,Stevenson等人<sup>[27]</sup>又证明大鼠 HSP70 能与 CaM 结合,并且发现 HSP70 内有一段高度保守的 21 个氨基酸残基组成的 CaM 结合序列。龚明<sup>[10]</sup>等报道, $\text{Ca}^{2+}$ 及 CaM 参与了玉米幼苗热激后耐热性的获得过程。周人刚等<sup>[1]</sup>证明高等植物玉米细胞质 HSP70 能依赖钙离子与钙调素结合,确定了 HSP70 内的钙调素结合位点,并且证明结合了钙调素的 HSP70 内源性 ATP 酶活性降低,提出了  $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$  和 HSP70 在热信号转导中可能的功能。

### 3 热激蛋白基因的表达调控

热激蛋白基因的表达的调节,包括选择性转录和选择性翻译<sup>[12]</sup>,生物体受到热激或其它环境胁迫时,这种调节可增加 HSP mRNA 10~100 倍,而其它基因的转录被抑制。生物体细胞内有一种转录调节因子在热激条件下可以激活热激基因的表达,被称为热激因子(HSF)。在热激基因中,5'端有一小段特异的 DNA 识别序列,是热激因子的结合位点,称为热激元件(HSE),热激因子与热激元件的结合就会激活热激基因的表达。细胞内热激因子有两种存在状态:非活性的单体和具有 DNA 结合活性的三聚体,而调节热激转录因子的则是热激蛋白本身,这是一个自我调节循环,热激转录因子仅仅是中介因子。1993年,Morimoto<sup>[28]</sup>提出了热激基因表达的调节模式,即在正常条件下,热激转录因子与热激蛋白 70 相互作用来保持不与 DNA 结合的非活性状态,在热激或其它胁迫时,错误折叠和凝聚的蛋白的增加就产生了一大群可以与热激转录因子竞争结合 HSP70 的底物,这样热激和其它刺激因子就除去了抑制热激转录因子的 DNA 结合活性的因素,释放出的热激转录因子组装成三聚体并结合到热激转录元件上,开启热激基因,进行热激蛋白的表达,表达出的热激蛋白中当然也包括大量的 HSP70,而积累的 HSP70 则又结合到热激转录因子上使其恢复到无活性的单体状态。大量实验表明

热激转录反应与细胞内蛋白的变性以及解折叠蛋白水平的提高相关。此外,Ali 等<sup>[13]</sup>和 Zou 等<sup>[14]</sup>分别证明 HSP90 也参与了热激转录因子活化过程的调节。

除选择性转录外,热激蛋白基因的表达调节还包括选择性的翻译。非洲爪蟾卵母细胞中存在着大量的 HSP70 的 mRNA,但只有在热激时才合成 HSP70,这种热激诱导的翻译过程可能与核糖体内某些蛋白在高温时的脱磷酸化作用有关。热激蛋白 mRNA 的选择性翻译与其 5'端不翻译的先导序列有关,果蝇 HSP70 mRNA 一旦消失其先导序列,即使高温时也不能翻译成热激蛋白。用融合基因实验证明,当 HSP70 启动子先导序列的 205 bp 融合到非热激诱导的乙醇脱氢酶基因系列上时,该基因能在高温下有效地翻译。植物中在对胡萝卜细胞和胚胎的实验结果表明,愈伤组织细胞中虽然积累了大量的热激蛋白 mRNA,但只有一部分翻译成热激蛋白,而在球状胚中尽管热激蛋白 mRNA 很少,但仍能被优先翻译,因此胡萝卜热激蛋白基因的表达调节主要是在翻译水平上。这种调节发生可能是某种变化使得球状胚热激蛋白 mRNA 能更好地与核糖体结合,使其有更高的表达效率。

### 4 海洋生物中热激蛋白的研究现状

热激蛋白不仅是热胁迫时大量表达的蛋白,也是其它环境胁迫时大量表达的蛋白,如低温、干旱、高渗透压及重金属等环境因素都能促使生物体表达热激蛋白。海洋生物中热激蛋白的研究近年来主要是关于恒定低温环境下生物体热激反应能力变化情况、生物体热耐受温度范围以及高渗透压下机体内热激蛋白的变化情况及功能等。由于热激蛋白在生物体耐热性方面的作用,许多学者试图找到环境温度与热激蛋白表达方式之间的关系<sup>[15,16]</sup>,例如,同一种鱼生活在墨西哥比生活在其北部的鱼体内 HSP70 的含量要高,而且不同区域的鱼体内 HSP70 的季节性变化也存在很大差异。Tomaneck 等<sup>[17]</sup>人比较了 4 种海洋中 snail 的热激反应,通过实验研究了这些生物的  $T_{on}$ (热激蛋白开始增加成时的温度)、 $T_{peak}$ (热激蛋白合成量最大时的温度)以及  $T_{off}$ (热激蛋白的合成不受热激活时的温度),同样发现,生活在不同地区的同一家族的生物这些温度域不同。

低温胁迫下热激蛋白的产生在植物、昆虫及啮齿类动物中都有报道<sup>[3]</sup>,对于海洋生物来说,南极的恒定低温为研究海洋生物的寒冷适应性提供了一个理想场所。Hofmann 认为南极海区常年处在  $-1.96\text{ }^{\circ}\text{C}$  的低温可能对某些在该海区生活的变温动物体内热激蛋白的表达有影响,目前他们至少已发现了一种南极鱼已经丧

失了热激后诱导产生热激蛋白的能力<sup>[18]</sup>,这种热激反应缺失正如同已发现的南极 ice fish 缺少血红蛋白和肌红蛋白<sup>[19]</sup>一样,都是生物体长期处在恒定的低温下的一种机体对环境适应的结果。同时,他们还发现尽管有些种在低温环境下生存了 2500 000 a, 并且缺少热刺激,但它们仍保存了机体热激后进行热激反应的能力<sup>[15]</sup>。

此外,海洋生物中有关热激蛋白研究比较多的就是高渗透压下热激蛋白的变化情况。野生的鲑鱼成长过程中有一个从淡水到海水的阶段,在商业养殖的鲑鱼中直接把幼鱼从淡水移到海水中时,由于渗透压的改变容易造成幼鱼死亡或生长缓慢。为了研究高渗下机体作用机理及提高商品养殖鲑鱼的成活率,以鲑鱼为材料对海水高渗透压下生物体内特殊蛋白的合成进行了大量的研究。1988年 Hoar<sup>[29]</sup>证明鲑鱼在从淡水到海水的洄游过程中体内循环系统中的皮质醇大量增加,1989年 McCormick<sup>[30]</sup>、1990年 Madsen 等人<sup>[31]</sup>证明外源性的糖皮质激素和皮质醇能刺激鲑鱼鳃组织细胞内氯细胞的分化以及钠钾泵酶 ( $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ ) 的产生,因此可知甾类激素在鲑鱼从淡水到海水的洄游过程中起了重要的作用。1998年, DuBeau 等<sup>[20]</sup>证明热激后鲑鱼体内产生的 HSP70 能提高其抗高渗的能力; 1999年 Smith<sup>[21]</sup>又证明暴露于高渗环境中的幼鲑鱼组织内 HSP70 的含量增加了 10 倍。Pan 等<sup>[22]</sup>从鲑鱼 cDNA 文库中克隆了一个 2 625 bp 的 cDNA,编码 722 个氨基酸的蛋白质,此蛋白氨基酸序列与斑马鱼的 HSP90 有 92% 的同源性,与人的 HSP90 有 89% 的同源性。实验结果发现高渗透压胁迫下鲑鱼鳃组织体内体外实验都能观察到 HSP90 mRNA 的积累,而鲑鱼的肾组织在高渗透压胁迫下都没发现 HSP90 mRNA 的积累。高温胁迫下,鳃组织和肾组织的体内体外实验都有明显的 HSP90 mRNA 的积累。这说明直接与环境接触的鳃组织比起内部组织来说热激反应更快更直接。

热激蛋白的研究是当今细胞生物学、生物化学中一个重要研究领域,其中心问题是热激蛋白的生物学功能。关于海洋生物中热激蛋白的功能目前尚不完全了解,但有一点可以肯定,即热激蛋白的诱导合成与海洋生物耐热性及耐盐性的获得有平行关系。海水养殖中,逆境因子是造成产量和品质下降的主要原因,其中就有温度和盐度,随着全球温度变暖及其它环境条件的改变,有必要进行海洋生物耐热、耐盐生物学机理的研究,这类研究不仅在学术上具有重要意义,还将对海水养殖业的发展起促进作用。

#### 参考文献

- 1 刘良式。植物分子遗传学。北京:科学出版社,1997。528 ~ 532
- 2 孙大业。细胞信号转导。北京:科学出版社,1998。91 ~ 92
- 3 Feder M. *et al.*. Heat shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology, *Annu. Rev. Phys.*, 1999, 61: 243 ~ 282
- 4 Gething M.J.. Guidebook to molecular Chaperones and Protein Folding Catalysts. Oxford, New York: Oxford University Press, 1997.
- 5 Bukau B. *et al.*. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines, *Cell*, 1998, 92: 351 ~ 366
- 6 Ludens J.. Cofactor-induced modulation of hsp70 is modified differentially by the hsp40 cochaperones SISI and YDJ1, *J. Biol. Chem.*, 1998, 243: 27 824 ~ 27 830
- 7 Pratt W.. The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase, *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol.*, 1997, 37: 297 ~ 326
- 8 Pratt W.. The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1998, 217: 420 ~ 434
- 9 Kang K.. The molecular chaperone hsp90 can negatively regulate the activity of a glucocorticosteroid-dependent promoter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96: 1 439 ~ 1 444
- 10 Gong M. *et al.*. Involvement of calcium and calmodulin in the acquisition of heat shock induced thermotolerance in maize, *J. Plant Physiol.*, 1997, 150: 615 ~ 621
- 11 Sun X. *et al.*. Binding of the maize cytosolic hsp70 to calmodulin, and identification of calmodulin-binding site in hsp70, *Plant Cell Physiol.*, 2000, 41(6): 804 ~ 810
- 12 Mori moto R.. Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators, *Genes Dev.*, 1998, 12: 3 788 ~ 3 796
- 13 Ali A. *et al.*. Evaluation of stress-inducible hsp90 gene expression as a potential biomarker in *Xenopus laevis*, *Cell Stress Chaperones*, 1998, 1: 62 ~ 65
- 14 Zou J. *et al.*. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress sensitive complex with HSF1, *Cell*, 1998, 94(4): 471 ~ 480
- 15 Roberts D. *et al.*. Heat shock protein expression in *Mtilus californianus*: Acclimatization (seasonal and tidal height

- comparison) and acclimation effects, *Biol. Bull*, 1997, 192: 309 ~ 320
- 16 Carpenter C., Hofmann G. . Expression of 70kDa heat shock proteins in antarctic and New Zealand notothenioid fish, *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 2000, 125: 229 ~ 238
- 17 Tomanek L., Somero G. . Evolutionary and acclimation-induced variation in the heatshock responses of congeneric marine snails (*Cerms tegula*) from different thermal habitats: implications for limits of the thermotolerance and biogeography, *J. Exp. Biol.*, 1999, 202: 2 925 ~ 2 936
- 18 Hofmann G. . Ecologically relevant expression and function of heat shock proteins in marine organisms, *Am. Zool.*, 1999, 39: 889 ~ 900
- 19 Sidell B. *et al.* . Variable expression of myoglobin among the hemoglobinless Antarctic icefishes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94: 3 420 ~ 3 424
- 20 Dubeau S. *et al.* . Thermal shock of salmon in vivo induces the heat shock protein hsp70 and confers protection against osmotic shock, *Aquaculture*, 1998, 168: 311 ~ 323
- 21 Smith T. *et al.* . Hsp70 and a 54 kDa protein (osp54) are induced in salmon (*Salmo salar*) in response to hyperosmotic stress, *J. Exp. Zool.*, 1999, 284: 286 ~ 298
- 22 Pan F. *et al.* . Cloning and characterization of salmon hsp 90 cDNA: upregulation by thermal and hyperosmotic stress, *J. EXP. Zool.*, 2000, 287: 199 ~ 212
- 23 Rochester D. *et al.* . The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, Hsp70, *EMBO J.*, 1986, 5: 451 ~ 458
- 24 Georgopoulos C. *et al.* . Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1993, 9: 601 ~ 634
- 25 Bohan S.P. . Hsp90 mutants disrupt glucocorticoid receptor ligand binding and destabilize aporeceptor complexes, *J. Biol. Chem.*, 1995, 270: 29 433 ~ 29 438
- 26 Stevenson M. *et al.* . Rapid increases in inositol trisphosphate and intracellular  $Ca^{2+}$  after heat shock, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 137: 826 ~ 833
- 27 Stevenson M. *et al.* . Members of the 70-kilodalton heat shock protein family contain a highly conserved calmodulin-binding domain, *Mol. Cell. Biol.*, 1990, 10: 1 234 ~ 1 238
- 28 Morimoto R. . Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes, *Science*, 1993, 259: 1 409 ~ 1 410
- 29 Hoar W. *et al.* . The physiology of smolting salmonids. In: Hoar W.S., Randall D.J., editors. *Fish physiology*, vol. 11B. San Diego: Academic Press, 275 ~ 343
- 30 McCormick S. *et al.* . In vitro stimulation of  $Na^+ - K^+$  - ATPase activity and ouabain binding by cortisol in coho salmon gill, *Am. J. Physiol.*, 1989, 256: R707 ~ R715
- 31 Madsen S. *et al.* . The role of cortisol and growth hormone in sea water adaptation and development of hypoxia regulatory mechanisms in sea trout parr (*Salmo trutta trutta*), *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1990, 79: 1 ~ 11