

粟酒裂殖酵母中 Hsp60 蛋白定位与表达水平的研究

王子璇, 商巾杰

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 对裂殖酵母 Hsp60 蛋白进行生物信息学与蛋白结构分析, 发现其与人和芽殖酵母分别有 56% 或 67% 的同源性和 71% 或 79% 的同源性. 使用 MitoProt II 软件预测显示其线粒体信号肽为 N 端前 33 个氨基酸, 且存在一个 Chaperonin Cpn60/TCP-1 family 结构域. 进一步研究发现, Hsp60 定位于线粒体基质. 通过检测野生型细胞在 30 ℃ 和 37 ℃ 条件下和不同生长时期的 Hsp60 蛋白水平, 发现 Hsp60 蛋白水平在 37 ℃ 条件下显著增加, 而在生长后期无变化.

[关键词] 线粒体, Hsp60, 热应激

[中图分类号] Q71 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-1292(2021)04-0087-06

Localization and Expression of Hsp60 Protein in *Schizosaccharomyces pombe*

Wang Zixuan, Shang Jinjie

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: In this paper, we analyze Hsp60 protein in *Schizosaccharomyces pombe* by bioinformatics and protein structure. Hsp60 shares 56% or 67% homology with human and 71% or 79% homology with budding yeast, respectively. The MitoProt II software predicts that the Mitochondria targeting sequence is the first 33 amino acids of N-terminal and that there is a Chaperonin Cpn60/TCP-1 family domain. We further find that Hsp60 is localized in the mitochondrial matrix. The Hsp60 protein level of wild-type cells at 30 ℃ and 37 ℃ and different growth stages are detected. It is found that the Hsp60 protein level increases significantly at 37 ℃, but does not change at the stationary phase.

Key words: mitochondria, Hsp60, heat stress

蛋白质的组装被认为是多肽一级序列本身固有特性的唯一结果. 然而, 在某些情况下, 需要来自其他蛋白质分子的结构信息才能正确折叠并随后组装成寡聚物^[1]. 这些“辅助”分子被称为分子伴侣, 其中一个亚家族是伴侣蛋白^[2], 包括 10 kDa 和 60 kDa 蛋白质. 分子伴侣在原核生物、叶绿体和线粒体中大量存在, 为正常细胞生长所必需, 且是应激诱导的, 在热休克条件下起到稳定或保护分解多肽的作用. 其中, Hsp60 属于一类 60-65 kDa 的分子伴侣, 是由 14-18 个亚基组成的双圆环形状蛋白结构^[3-4]. 一般来说, 细胞中通过转录、翻译后产生的多肽通过与 Hsp10 复合体相互作用, 在 Hsp60 复合体的空腔中折叠成正确的蛋白结构, 这一过程需要 ATP 的参与^[5].

Hsp60 属 I 类分子伴侣, 又被称为 HSPD1 或 Cpn60, 存在于线粒体中维持其蛋白质稳态. 其在健康和疾病中发挥着多重作用, 尤其是作为一系列获得性和遗传性疾病的致病因子^[6-8]. 因其有望给分子伴侣疾病的诊断和治疗方法带来新的发展, 如各类癌症、炎症、自身免疫性疾病及一系列神经退行性疾病^[8-11], Hsp60 抑制剂和调节剂可能会作为新型抗癌药物发挥功能^[12], 近年来国内外学者对 Hsp60 的研究兴趣一直在稳步增长.

粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)作为模式生物, 为分析高等真核生物的基因结构和功能提供了极好的模型系统. 相较于另一种模式生物——芽殖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), 裂殖酵母细胞中热休克蛋白的转录调控与哺乳动物细胞中的转录调控模式更为相似^[13]. 目前对裂殖酵母中热休克蛋白的研

收稿日期: 2021-03-30.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31400032)、江苏高校自然科学研究项目(13KJB180010).

通讯作者: 商巾杰, 博士, 副教授, 研究方向: 裂殖酵母中与人类疾病相关基因的结构和功能. E-mail: jinjieshang@njnu.edu.cn

究还不多. 本文对粟酒裂殖酵母中 Hsp60 蛋白进行了研究, 经生物信息学分析研究发现, Hsp60 定位于线粒体基质. Hsp60 蛋白水平在高温刺激时显著增加, 而生长时间对其蛋白表达无影响, 这也为今后利用 Hsp60 作为线粒体蛋白表达的参照物提供了理论基础.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与培养基

粟酒裂殖酵母 yHL6381(*h+leu1-32 his3-D1 ura4-D18 ade6-M210*), 由南京师范大学微生物所实验室保存, 培养基为 YES(100 mL): 3 g 葡萄糖, 0.5 g 酵母粉, 20 mg Adenine, 20 mg L-histidine, 20 mg L-leucine, 20 mg Uracil.

1.1.2 实验试剂

酵母粉购自 OXOID; Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* 购自 Sigma-Aldrich; Western Blot 中使用的抗体购自金斯瑞生物科技股份有限公司; 其他常用试剂购自南京丁贝生物科技有限公司.

S buffer: sorbitol 25.48 g, HEPES 0.9532 g, 1 mol/L $MgCl_2$ 50 μ L. 加 80 mL 超纯水完全溶解, 用 KOH 调节 pH 至 6.5, 用双蒸水溶解至 100 mL, 4 $^{\circ}C$ 保存.

匀浆 buffer: 2 mol/L 山梨醇 30.0 mL, 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 1.0 mL, 0.1 mol/L EDTA 1.0 mL, 10 mmol/L PMSF 1.0 mL, 用双蒸水溶解至 100 mL.

SEM buffer: 100 mmol/L MOPS (pH 7.2) 10.0 mL, 2.5 mol/L 蔗糖 10.0 mL, 0.1 mol/L EDTA 1.0 mL, 用双蒸水溶解至 100 mL.

Extraction buffer: 0.1 mol/L Na_2CO_3 , 1 mmol/L PMSF, 1 μ g/mL pepstatin, 用 NaOH 调 pH 至 11.5.

Solubilization solution: 2% SDS, 0.8% β -巯基乙醇, 20% 甘油, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 0.02% 溴酚蓝.

1.2 实验方法

1.2.1 线粒体的粗提取

取 YES 固体培养基上的酵母菌, 接入 5 mL YES 中, 30 $^{\circ}C$, 200 r/min 振荡培养 12 h. 将培养的母液转接至 200 mL YES 液体培养基中, 调节起始 $OD_{600} = 0.2$, 30 $^{\circ}C$ 与 37 $^{\circ}C$, 200 r/min 振荡培养 12 h, 收菌. 用超纯水和 S buffer 各清洗一遍菌体, 离心收菌. 用 S buffer 重悬菌体, 称重菌体, 加入菌体质量 4 倍的 S buffer 和 1/10 倍溶壁酶 Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum*, 37 $^{\circ}C$ 200 r/min 孵育 2~4 h, 用显微镜观察裂解情况, 裂解至 80% 以上的酵母变圆后离心收菌, 加入菌体 4 倍体积的预冷的匀浆 buffer 吹打混匀, 将菌液转移至 Dounce 组织匀浆器中, 冰上研磨 15~20 次. 4 $^{\circ}C$ 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清液. 4 $^{\circ}C$ 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 重复一次. 4 $^{\circ}C$ 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液. 加 5 mL SEM buffer, 置于冰上吹打混匀. 4 $^{\circ}C$ 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液. 沉淀为粗线粒体. 加 1 mL SEM buffer, 重悬沉淀, -80 $^{\circ}C$ 保存.

1.2.2 分离线粒体基质蛋白与膜蛋白

取 1.2.1 中提取的粗线粒体, 4 $^{\circ}C$ 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液. 加入预冷的 Extraction buffer 重悬线粒体, 冰浴 30 min, 每 10 min 混匀一次. 冰浴结束后超速离心, 4 $^{\circ}C$ 100 000 g 离心 1 h. 取上清液, 4 $^{\circ}C$ 100 000 g 再次超速离心 1 h. 取上清液, 加入等体积 20% 三氯乙酸溶液, 冰上沉降 15 min. 4 $^{\circ}C$ 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 用 1 mL 预冷的丙酮重悬沉淀. 4 $^{\circ}C$ 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 于室温挥发丙酮. 加入 Solubilization solution 重悬沉淀, 此时样品为可溶性蛋白和与膜结合力弱的蛋白 (S). 取第一次超速离心的沉淀, 加入预冷的 Extraction buffer 重悬, 4 $^{\circ}C$ 100 000 g 超速离心 1 h, 弃上清液. 加入 Solubilization solution 重悬沉淀, 此时样品为疏水性膜蛋白 (P). 蛋白样品煮沸后可用于 Western Blot 检测, 或 -80 $^{\circ}C$ 保存.

1.2.3 Western Blot 检测蛋白水平

取粗线粒体样品, 加入 5 \times Protein Loading buffer 后 100 $^{\circ}C$ 煮沸 10 min, 上样于 12% 聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 电泳. 300 mA, 90 min 转膜. Blocking buffer (0.137 mol/L NaCl, 0.02 mol/L Tris, 5% 脱脂奶粉) 封

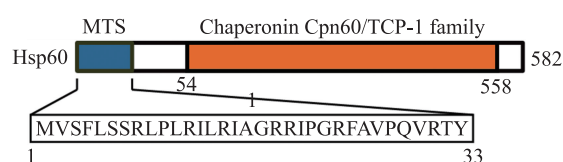
闭 NC 膜 1.5 h. TBST(0.02 mol/L Tris,0.137 mol/L NaCl,0.1% Tween 20,调 pH 至 7.4)振荡清洗,加入一抗,4 ℃ 12 h 或常温 2 h 孵育,TBST 清洗后,加入二抗,避光孵育 1 h,ODYSSEY 扫描显示结果.

2 结果与讨论

2.1 Hsp60 蛋白结构分析

使用 MitoProt II 软件预测 Hsp60 的线粒体定位序列(mitochondria targeting sequence,MTS),显示其定位于线粒体信号肽为 N 端前 33 个氨基酸,具体序列为 MVSFLLSSSVSRLLPLRIAGRRIPGRFAVPQVRTY,其中包含 6 个碱性氨基酸和 6 个羟基氨基酸残基,但没有酸性氨基酸残基.在 Pfam 数据库中,Hsp60 蛋白存在一个 Chaperonin Cpn60/TCP-1 family 结构域,其位置为第 54 到第 558 个氨基酸,如图 1 所示.

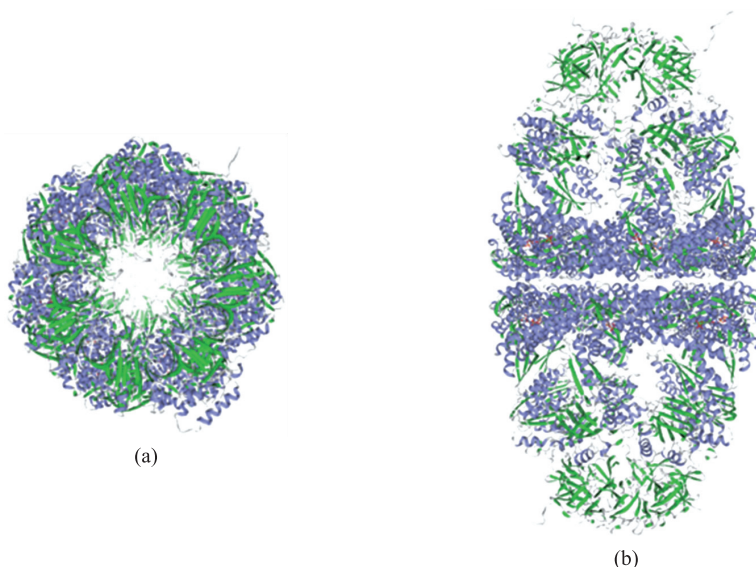
使用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>)对 Hsp60 蛋白质结构进行同源建模,蛋白三维结构模型的模板为 *Homo sapiens* HSPD1 (SMTL id 4pj1.1),序列相似度为 56.90%. Hsp60 二级结构主要由 α 螺旋(紫色)与 β 折叠(绿色)构成,模型显示了一种“美式足球”型中间物,有 14 个亚基,由两个 7 亚基的分子伴侣环组成,如图 2 所示.



MTS:线粒体定位序列

图 1 Hsp60 蛋白特征

Fig. 1 Protein features of Hsp60



紫色显示 α 螺旋结构;绿色显示 β 折叠结构

图 2 Hsp60 蛋白三维结构

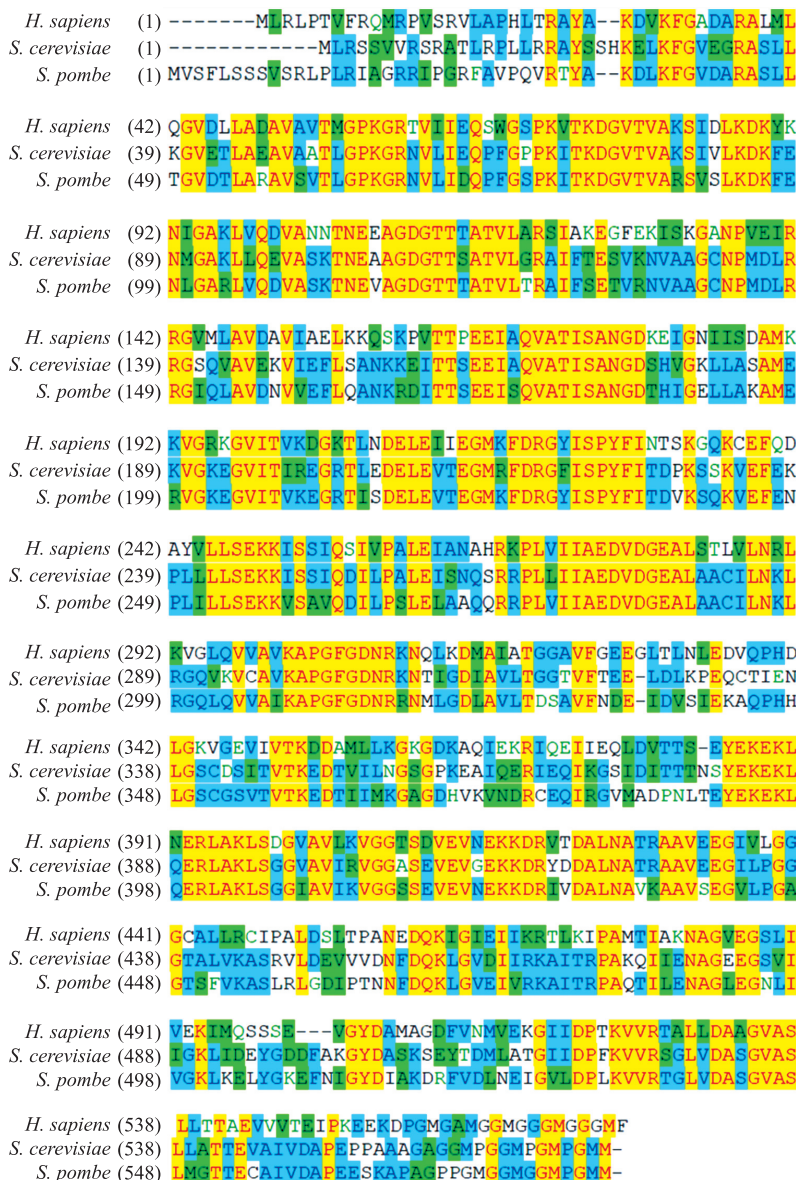
Fig. 2 3D structure of Hsp60

2.2 生物信息学分析

本研究通过 NCBI 数据库分析发现了芽殖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 与人类 (*Homo sapiens*) 的 Hsp60 的同源基因,并对其蛋白序列进行了生物信息学比对,如图 3 所示.可以发现,在蛋白中段属于 Chaperonin Cpn60/TCP-1 family 结构域中有大量相同序列与保守序列(黄色、蓝色),而 N 端的线粒体定位序列部分有较大差异.其中,Hsp60 与人和芽殖酵母分别有 56%或 67%的同源性和 71%或 79%的同源性.本研究在 117—122 位氨基酸序列中发现了一个高度保守的 ATP 结合位点(GDGTIT/S),且在 C 端发现了一个富含 Gly+Met 的模体.

2.3 Hsp60 蛋白定位

为了证实 Hsp60 的线粒体定位,首先通过粗提线粒体方法,用 Hsp60 自身抗体检测其不同细胞组分中的表达量.检测发现,在线粒体(M)和全细胞蛋白(T)中可检测得到 Hsp60,除线粒体以外的部分(PMS)Hsp60 信号极弱,说明 Hsp60 定位于线粒体而不是细胞质或其他组分,如图 4(a)所示.



黄色表示相同序列;绿色表示微弱相似度序列;蓝色表示保守序列

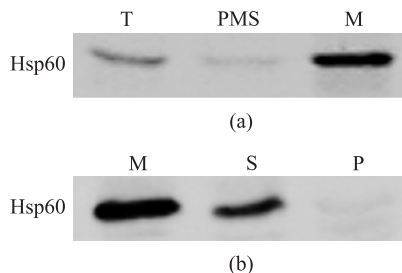
图 3 Hsp60 同源蛋白序列比对

Fig. 3 Protein sequence alignment of Hsp60 homologous

为进一步探究 Hsp60 在线粒体中的定位,使用 Na_2CO_3 处理粗提线粒体. 使用 Na_2CO_3 处理线粒体后,线粒体膜会破碎,释放出基质蛋白,通过离心方法,即可分离线粒体基质蛋白与膜蛋白. 若蛋白信号在上清(S)中能够检测得到,则说明蛋白质定位于线粒体基质;若蛋白信号在沉淀(P)中能够检测得到,则说明蛋白质定位于线粒体膜上. 检测结果如图 4(b)所示,只有在粗提线粒体(M)和上清(S)中可检测到 Hsp60 蛋白信号,说明 Hsp60 定位于线粒体基质而不是线粒体膜上.

2.4 不同生长条件下 Hsp60 蛋白表达量研究

本文检测了野生型细胞在 30 °C 和 37 °C 条件下 Hsp60 蛋白水平,以及生长对数期和稳定期的蛋白水平,如图 5 所示. 细胞在 30 °C 和 37 °C 培养 12 h 后,提取线粒体,检测其 Hsp60、Cox4 蛋白的表达量,其中 Cox4 作为对照内参. 可以发现,Hsp60 蛋白水平在 37 °C 条件下显著增加(见图 5(a)). 本文还检测了细胞在正常生长条件下的



T:全细胞;PMS:上清;M:粗提线粒体;S:上清;P:沉淀

图 4 Hsp60 定位于线粒体

Fig. 4 Hsp60 locates in the mitochondria

Hsp60 蛋白水平. 细胞在 30 ℃ 培养 12 h、60 h 后,提取线粒体,检测其 Hsp60、Cox4 蛋白的表达量,其中 Cox4 作为对照内参. 可以发现,在生长对数期和稳定期 Hsp60 蛋白水平无明显变化(见图 5(b)).

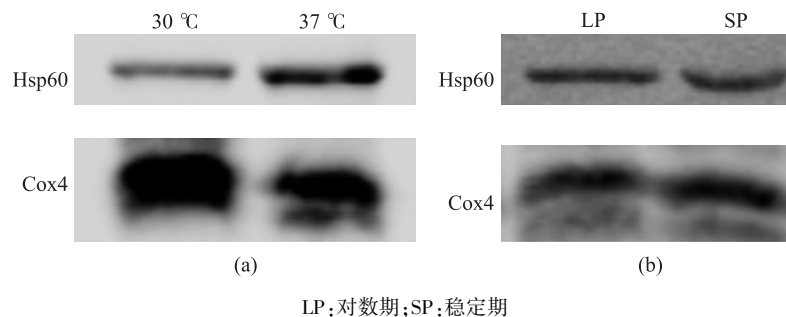


图 5 不同生长条件下 Hsp60 蛋白表达量

Fig. 5 Hsp60 Protein expression at different temperatures

3 结论

本文经生物信息学研究分析,发现裂殖酵母 Hsp60 是一类高度保守的蛋白,其中部属于 Chaperonin Cpn60/TCP-1 family 结构域的氨基酸序列在人、芽殖酵母中都具有相似性. Chaperonin Cpn60/TCP-1 family 结构域在原核生物、真核生物中都十分保守,其蛋白家族包含两种伴侣蛋白,一种为 10 kDa 伴侣蛋白(细菌中的 Cpn10-或 GroES),以 6-8 个相同亚基的环状寡聚物形式存在;另一种为 60 kDa 伴侣蛋白(细菌中的 Cpn60-或 GroES),由 2 个堆叠的环组成,每个环包含 7 个相同的亚基,Hsp60 属于此类伴侣蛋白.

Hsp60 在 N 端含有线粒体定位序列,由细胞核基因编码,在细胞质中合成后定位于线粒体的蛋白质. 芽殖酵母中的 HSP60 会定位于线粒体并在线粒体内正确加工为有功能的蛋白质^[14]. 人类可以检测到 HSPD1 在细胞中定位于线粒体基质^[15]. 除此之外,其定位还与细胞状态密切相关,如诱导细胞凋亡过程中 HSPD1 会在细胞质内积累^[16]. 本文通过提取细胞线粒体及使用 Na_2CO_3 处理线粒体,通过 Western Blot 方法检测蛋白水平,发现 Hsp60 定位于线粒体基质.

Hsp60 作为一个高度保守的热激蛋白,在不同的物种中已被广泛研究. 在芽殖酵母中,当细胞从 25 ℃ 转移到 39 ℃ 条件下培养时,Hsp60 的 mRNA 水平会升高 2~3 倍^[17]. 而在裂殖酵母中仅有文献报道,25 ℃ 培养的细胞转移到 35 ℃ 培养条件下时,Hsp60 的 mRNA 水平会瞬间升高,然后逐渐降低^[18],而蛋白水平的变化还未知. 本文检测了不同条件下 Hsp60 的蛋白水平,发现 Hsp60 在 37 ℃ 热激条件下,其蛋白表达量显著增加,之后会轻微降低,这与 mRNA 水平一致,说明 Hsp60 在高温刺激下蛋白表达水平上升,是一个定位于线粒体基质的热激蛋白.

本研究发现在使用 Western Blot 方法研究不同生长时期线粒体蛋白水平变化时,Hsp60 蛋白表达量保持不变,因此可使用 Hsp60 与 Cox4 作为内参蛋白;由于 Hsp60 在热激条件下表达量会显著上升,在研究热激条件下线粒体蛋白水平变化时应使用 Cox4 作为内参蛋白,而不能使用 Hsp60. 本研究表明,Hsp60 可以为研究线粒体蛋白不同生长时期表达量水平提供良好的内参工具.

[参考文献] (References)

- [1] HEMMINGSEN S M, WOOLFORD C, van der VIES S M, et al. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly[J]. *Nature*, 1988, 333(6171): 330-334.
- [2] PRASAD T K, STEWART C R. cDNA clones encoding *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays* mitochondrial chaperonin HSP60 and gene expression during seed germination and heat shock[J]. *Plant Molecular Biology*, 1992, 18(5): 873-885.
- [3] HENDRICK J P, HARTL F U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1993, 62: 349-384.
- [4] KUBOTA H, HYNES G, CARNE A, et al. Identification of six Tcp-1-related genes encoding divergent subunits of the TCP-1-containing chaperonin[J]. *Current Biology*, 1994, 4(2): 89-99.
- [5] GAUDET P, LIVSTONE M S, LEWIS S E, et al. Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene

- Ontology consortium[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2011, 12(5): 449–462.
- [6] CAPPELLO F, GAMMAZZA A M, PICCTONELLO A P, et al. Hsp60 chaperonopathies and chaperonotherapy: targets and agents[J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2014, 18(2): 185–208.
- [7] HOTER A, RIZK S, NAIM H Y. The Multiple Roles and Therapeutic Potential of Molecular Chaperones in Prostate Cancer[J]. *Cancers*, 2019, 11(8): 1194.
- [8] van EDEN W, JANSEN M A A, LUDWIG I S, et al. Heat shock proteins can be surrogate autoantigens for induction of antigen specific therapeutic tolerance in rheumatoid arthritis[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 279.
- [9] BROSS P, MAGNONI R, BIE A S. Molecular chaperone disorders: defective Hsp60 in neurodegeneration[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2012, 12(22): 2491–2503.
- [10] MENG Q L, LI B B X, XIAO X S. Toward developing chemical modulators of Hsp60 as potential therapeutics[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2018, 5: 35.
- [11] HOTER A, RIZK S, NAIM H Y. The multiple roles and therapeutic potential of molecular chaperones in prostate cancer[J]. *Cancers*, 2019, 11(8): 1194.
- [12] STEVENS M, ABDEEN S, SALIM N, et al. HSP60/10 chaperonin systems are inhibited by a variety of approved drugs, natural products, and known bioactive molecules[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2019, 29(9): 1106–1112.
- [13] GALLO G J, SCHUETZ T J, KINGSTON R E. Regulation of heat shock factor in *Schizosaccharomyces pombe* more closely resembles regulation in mammals than in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, 11(1): 281–288.
- [14] HALLBERG E M, SHU Y, HALLBERG R L. Loss of mitochondrial hsp60 function: nonequivalent effects on matrix-targeted and intermembrane-targeted proteins[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, 13(5): 3050–3057.
- [15] SINGH B, PATEL H V, RIDLEY R G, et al. Mitochondrial import of the human chaperonin (HSP60) protein[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1990, 169(2): 391–396.
- [16] CHANDRA D, CHOY G, TANG D G. Cytosolic accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release: evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(43): 31289–31301.
- [17] READING D S, HALLBERG R L, MYERS A M. Characterization of the yeast HSP60 gene coding for a mitochondrial assembly factor[J]. *Nature*, 1989, 337(6208): 655–659.
- [18] YOSHIDA H, YANAGI H, YURA T. Cloning and characterization of the mitochondrial HSP60-encoding gene of *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Gene*, 1995, 167(1–2): 163–166.

[责任编辑: 严海琳]

(上接第 79 页)

- [18] RYAN N, ANDERSON K, VOLPEDO G, et al. STAT1 inhibits T-cell exhaustion and myeloid derived suppressor cell accumulation to promote antitumor immune responses in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *International Journal of Cancer*, 2020, 146(6): 1717–1729.
- [19] SASIDHARAN N V, TOOR S M, ALI B R, et al. Dual inhibition of STAT1 and STAT3 activation downregulates expression of PD-L1 in human breast cancer cells[J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2018, 22(6): 547–557.
- [20] CHENG Q, FENG Q, XU Y, et al. BRCC36 functions noncatalytically to promote antiviral response by maintaining STAT1 protein stability[J]. *SSRN Electronic Journal*, 2021, 51(2): 296–310.
- [21] ZHANG Y H, ZHOU C J, ZHOU Z R, et al. Domain analysis reveals that a deubiquitinating enzyme USP13 performs non-activating catalysis for Lys63-linked polyubiquitin[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29362.
- [22] CAPPELLESSO R, MARIONI G, CRESCENZI M, et al. The prognostic role of the epithelial-mesenchymal transition markers E-cadherin and Slug in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Histopathology*, 2015, 67(4): 491–500.
- [23] PAN C M, WANG M L, CHIOU S H, et al. Oncostatin M suppresses metastasis of lung adenocarcinoma by inhibiting SLUG expression through coordination of STATs and PIASs signalings[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(37): 60395–60406.

[责任编辑: 严海琳]