

基于细胞质的叶绿体蛋白靶向机制

张智勇^{1,2,3}, 李国瑞^{3,4}, 邱 静^{1,3}, 罗 蕊^{1,3}, 李雪雁⁴, 任国双⁴, 陈永胜^{3,4}

(1. 内蒙古民族大学农学院, 内蒙古 通辽 028042; 2. 通辽市农业科学研究院, 内蒙古 通辽 028015; 3. 内蒙古民族大学生命科学学院, 内蒙古 通辽 028042; 4. 内蒙古自治区高校蓖麻产业研究中心, 内蒙古 通辽 028042)

摘要:叶绿体是植物唯一能够进行光合作用的细胞器, 叶绿体大部分的蛋白质来自核基因的转译, 通过论述蛋白质导向叶绿体之前在胞质中的机理, 阐述了胞质中未折叠蛋白的控制机理。

关键词:叶绿体; 胞质因子; 转运肽; TOC

中图分类号: Q349.55

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2013)01-0125-03

叶绿体是植物唯一能够进行光合作用的细胞器。除自身转译蛋白质外, 约 95% 叶绿体蛋白质是由核基因组编码翻译的, 这些蛋白质在胞质中翻译完成后转运至叶绿体。叶绿体含有 3 种膜结构: 外膜、内膜和类囊体膜, 也由此划分出 3 种液态环境: 膜间质、基质和类囊体腔。

该文主要论述了胞质中蛋白质导向叶绿体的反应机理, 并且阐述了胞质中未折叠蛋白数量的控制机制。蛋白前体在胞质因子(如 14-3-3 蛋白, Hsp70, Hsp90 和 FKBP 等)的介导下转运至叶绿体, 再依次与外膜转位子 TOC 和内膜转位子 TIC 结合来实现蛋白前体的跨膜转运。转运完成后, 成熟蛋白在基质中经过折叠加工具有活性。

1 叶绿体蛋白质的转运肽

蛋白质 N 末端含有一个信号序列, 称之为转运肽^[1]。目前已经运用了多种不同方法研究转运肽序列, 包括氨基酸组成分析, 缺失异位突变法和导肽空间结构分析等^[2]。这些研究发现转运肽具有如下性质: 含有大量的羟基化氨基酸和丙氨酸、缺少酸性氨基酸、存在短序列基元、疏水环境中易形成 α 螺旋结构。另外转运肽具有结合叶绿体特有类脂 MGDG 的能力, 这提供了特异性结合外膜转位子 Toc159 或 Toc34 的基础。Toc159 是

蛋白前体的第一受体。

利用拟南芥原生质体进行活体内靶向试验, 并结合生物信息学相关技术研究转运肽特性, 将 208 种叶绿体蛋白聚类分组: RbcS, Cab, BCCP, DnaJ-J8, PORA, TOCC, Glu2 共 7 组^[3]。当叶绿体蛋白的转运肽与多种亚基结合时, 叶绿体蛋白从大量胞质蛋白中分离出来的准确度增加。转运受体像 Toc159 可能具有很强的伸缩性来识别多种不同转运肽。RbcS 和 Cab 蛋白具有不同的转运肽, 但却通过相同的受体通道(Toc159)^[4]。

对转运肽进行详细的分析研究表明, 多种序列基元与叶绿体蛋白前体-受体复合物和蛋白的跨膜转运有关。虽然转运肽不同亚族中存在序列不同, 但却具有共同的特性^[5]。RbcS, PORA, TOCC 和 DnaJ-J8 的转运肽前 10 个氨基酸序列中存在的疏水残基对靶向叶绿体有非常重要的作用。叶绿体蛋白的转运肽如 RbcS, OE23, OE33 和 PORA 含有与胞质因子 14-3-3 的结合序列^[6]。

2 叶绿体蛋白的胞质因子

细胞器蛋白转运有自身的靶向作用或者是小泡聚集 2 种方式。靶向作用方式的细胞器有内质网(ER)、线粒体、细胞核、叶绿体和过氧化物酶体。小泡聚集作用的有高尔基体、质膜、液泡和溶酶体等。细胞器蛋白的直接定向作用由胞质因子识别转运肽来介导。ER 蛋白的疏水残基经信号识别蛋白(SRP)识别。核蛋白的核定位信号(NLS)由转运因子在胞质中识别^[7]。胞质因子 PEX-5 识别过氧化物酶体蛋白的 C 末端 PTS-1, 而 PEX-7 识别 N 端的 PTS-2^[8]。同样, 在线粒体蛋白的转运过程中, 有多种胞质因子参与蛋白质靶向作用。线粒体靶向刺激因子(MSF), 是一个

收稿日期: 2012-12-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31160290); 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(NCET-08-0870); 公益性行业(农业)科研专项资助项目(201003057)

第一作者简介: 张智勇(1979-), 男, 内蒙古自治区鄂尔多斯市人, 在读硕士, 助理研究员, 从事蓖麻育种与分子生物学研究。E-mail: 15248391509@163.com。

通讯作者: 陈永胜(1971-), 男, 内蒙古自治区通辽市人, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 从事植物分子生物学研究。E-mail: 13754059963@163.com。

由 32 kD 的大亚基和 30 kD 的小亚基组成的二聚体^[9]。它与肽链前端的碱性氨基酸相互作用引导线粒体蛋白转运,多肽链与核糖体的复合物(NAC)一同进入线粒体基质中^[10]。胞质中 Tom20 结合蛋白识别 FK506 凝集蛋白的同系物芳香烃受体蛋白(AIP)^[11],引导 AIP 结合线粒体蛋白前体,形成一个三元复合物来维持转运能力。研究显示 AIP 具有抑制多肽链的聚集性质,从而对线粒体蛋白的转运起到至关重要的作用。

在叶绿体蛋白前体转运过程中和线粒体相似,需要多种胞质因子参与。14-3-3 特异性地结合叶绿体蛋白转运肽^[12]。T. May 从小麦胚芽的提取液中发现的 14-3-3 与叶绿体蛋白前体二聚物和胞质因子 Hsp70 形成一个复合物,指导定向作用^[13]。活体外研究显示,这种复合物比单纯的蛋白前体对叶绿体的靶向能力强。14-3-3 的丝氨酸或苏氨酸需要经过蛋白激酶(STY8, STY17, STY46)磷酸化过程,而后才能具有活性指导叶绿体蛋白前体的转运。叶绿体蛋白质是以磷酸化状态靶向叶绿体外膜受体,而线粒体、过氧化物酶体蛋白是未磷酸化状态。这也说明了 14-3-3 是叶绿体蛋白前体转运特有的一种介导因子。

Hsp90 作为分子伴侣参与蛋白多肽链转运,先前认为混合物就像船舶停靠码头一样直接结合 Toc34,试验发现并非如此,Hsp90 与蛋白前体混合物首先结合 Toc64(Hsp90 的 C 末端和 Toc64 的 TPR 亚基相互作用),随之,蛋白前体从 Toc64 传递至转运通道 Toc75,进入叶绿体^[14]。虽说这种复合物传递方式在植物体中是叶绿体蛋白所独有的,但 Hsp90-Toc64 系统相当于动物体中线粒体的 Hsp70/90-Tom70 系统^[15]。但植物线粒体没有 Tom70 因子,是含有 mtOM64(Toc64 同系物,C 末端含有 TPR 亚基)。

将 Toc64 所有亚基基因敲除发现,叶绿体蛋白质的转运依旧可以正常进行^[16]。这说明 Toc64 并不是叶绿体蛋白转运所必需的,在其被敲除后,还存在其它转运途径。至今,一共发现两条跨膜转运途径^[17-18](见图 1)。一个是 Toc159/Toc33 途径,供与光合作用相关的蛋白前体通过,如 RbcS。另一种是 Toc132 或者 Toc120/Toc34 途径,供叶绿体自身的组成蛋白通过,如丙酮酸脱氢酶的 E1 α 亚基。

翻译后,几种胞质因子识别叶绿体蛋白前体 N 末端转运肽。胞质因子 Hsp70 和 Hsp90 识别并结

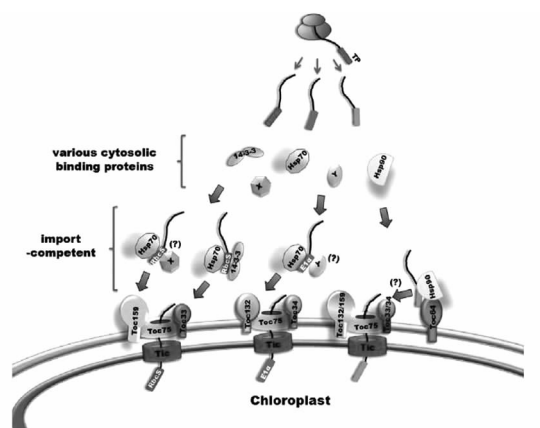


图 1 蛋白质转入叶绿体整个过程概况

Fig. 1 Overview of the mechanism of the targeting of chloroplasts proteins

合叶绿体蛋白前体。叶绿体蛋白如 RbcS 和 OE23 的转运肽胞质因子都包含 14-3-3 的识别序列。14-3-3 引导蛋白前体与外膜受体 Toc34 结合。蛋白前体与 14-3-3 和 Hsp70 的复合物转运能力有明显提高。至于非光合作用蛋白,如丙酮酸脱氢酶 E1 α 亚基,通过 Toc132/120 转运至叶绿体^[16]。

3 叶绿体蛋白前体数量控制机制

蛋白质只有在特定位点经过正确的折叠修饰后才能具有活性。像紫外线、热激等非生物刺激都会使蛋白质失活^[19]。胞质中的蛋白前体更易于形成非特异性聚合物,这些聚合物对细胞的正常代谢有很大的威胁。然而,在细胞质中蛋白前体数量却是很低的^[20]。胞质蛋白数量控制机制有 2 种方式:协助蛋白肽链正确的转运折叠;对于错误折叠的聚合蛋白,则促进 26S 蛋白酶体介导的蛋白质降解过程^[21]。

叶绿体蛋白转译是在转入叶绿体之前在胞质中完成,然后穿过叶绿体两层膜后在基质中折叠、修饰。因此这些蛋白质是以未折叠肽链状态在胞质中存在,这对正常的细胞代谢可能有一定的损害^[19-20]。现在理论认为,蛋白前体与胞质因子的结合对未折叠的多肽链非特异性聚集有一定的阻止作用^[13]。体外叶绿体研究发现,尽管有这些保护措施的存在,但未折叠蛋白对细胞的伤害可能也依旧存在,特别是当蛋白质合成水平超过转运水平时,未折叠多肽链大量聚集,形成非特异性的细胞毒素聚合物^[22]。

最近, Lee 等^[4]研究发现,叶绿体蛋白前体在胞质中的降解是通过胞质中的 Hsc70-4 和 CHIP 介导的 26S 蛋白降解作用实现的。RbcS 和 Cab

类多肽链的转运肽中含有能够与 Hsc70-4 和 AtCHIP 结合的 2 个序列,如 RbcS 的 N 末端序列 VASPA 可以与 Hsc70-4 结合。过剩的叶绿体蛋白前体还可以在 26S 蛋白酶体介导下实现降解。将编码叶绿体外膜转位子(TOC)蛋白的 AtTOC159 基因敲除(ppi2),造成叶绿体蛋白多肽转运受阻,从而多肽链大量淤积在胞质中。Hsc70-4 和 AtCHIP-E3 连接酶的表达水平均有明显升高。这证明植物细胞包含一种检测蛋白前体水平并启动除去胞质中蛋白前体相关的基因的机制^[4]。研究 Hsc70-4RNAi 突变体,这种植株表现出幼苗致死,推测因为胞质中蛋白前体过多引起的细胞毒性死亡^[4]。在胚胎发育期,每一个细胞对未来的发育都表现出关键作用。一个胚胎细胞死亡会导致严重的发育性缺陷。

4 结论

近来对基于细胞质的叶绿体蛋白靶向研究已经有了新的突破,但也同时引出新的疑问。如叶绿体蛋白质在靶向叶绿体之前要经过正确的分类,但这些蛋白质是如何分类后靶向叶绿体的机制尚不清楚;RbcS, PORA, TOCC 和 DnaJ-J8 的转运肽前 10 个氨基酸序列中存在的疏水残基是如何经胞质因子识别引导其靶向叶绿体,目前尚不明瞭;目前对叶绿体的膜蛋白在胞质中机制尚不能在分子水平得以解释。

对于叶绿体未折叠蛋白质的数量控制机制暂不能完全解释清楚。最主要的一个原因可能是叶绿体蛋白质靶向机制研究,主要是利用经过体外纯化的叶绿体,这对胞质中的正常机制研究造成一定的局限性。

这些问题是叶绿体蛋白靶向机制进一步研究的基础,并且对叶绿体蛋白靶向提供非常重要的线索。

参考文献:

- [1] Li H M, Chiu C C. Protein transport into chloroplasts [J]. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2010, 61: 157-180.
- [2] Bruce B D. The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure, *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, 1541: 2-21.
- [3] Lee D W, Kim J K, Lee S, et al. Arabidopsis nuclear-encoded plastid transit peptides contain multiple sequence subgroups with distinctive chloroplast-targeting sequence motifs [J]. *Plant Cell*, 2008, 20: 1603-1622.
- [4] Lee S, Lee D W, Lee Y, et al. Heat shock protein cognate 70-4 and an E3 ubiquitin ligase, CHIP, mediate plastid-derived precursor degradation through the ubiquitin-26S proteasome system in Arabidopsis [J]. *Plant Cell*, 2009, 21: 3984-4001.
- [5] Lee D W, Lee S, Lee G J, et al. Functional characterization of sequence motifs in the transit peptide of Arabidopsis small subunit of rubisco [J]. *Plant Physiol*, 2006, 140: 466-483.
- [6] Schemenewitz A, Pollmann S, Reinbothe C, et al. A substrate independent, 14:3:3 protein-mediated plastid import pathway of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase A [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104: 8538-8543.
- [7] Sorokin A V, Kim E R, Ovchinnikov L P. Nucleocytoplasmic transport of proteins [J]. *Biochemistry*, 2007, 72: 1439-1457.
- [8] Rucktäschel R, Girzalsky W, Erdmann R. Protein import machineries of peroxisomes [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011, 1808: 892-900.
- [9] Alam R, Hachiya N, Sakaguchi M, et al. cDNA cloning and characterization of mitochondrial import stimulation factor(MSF) purified from rat liver cytosol [J]. *Biochem*, 1994, 116: 416-425.
- [10] Fünfschilling U, Rospert S. Nascent polypeptide-associated complex stimulates protein import into yeast mitochondria [J]. *Mol. Biol. Cell*, 1999, 10: 3289-3299.
- [11] Yano M, Terada K, Mori M. AIP is a mitochondrial import mediator that binds to both import receptor Tom20 and preproteins [J]. *J. Cell Biol.*, 2003, 163: 45-56.
- [12] 赵云, 杜林方, 王茂林, 等. 蛋白质向叶绿体的转运 [J]. *植物生理学通讯*, 2002, 38(5): 487-492.
- [13] May T, Soll J. 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants [J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 53-64.
- [14] Qbadou S, Becker T, Mirus O, et al. The molecular chaperone Hsp90 delivers precursor proteins to the chloroplast import receptor Toc64 [J]. *EMBO J.*, 2006, 25: 1836-1847.
- [15] Young J C, Hoogenraad N J, Hartl F U. Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70 [J]. *Cell*, 2003, 112: 41-50.
- [16] Lee D W, Lee S, Oh Y J, et al. Multiple sequence motifs in the rubisco small subunit transit peptide independently contribute to Toc159-dependent import of proteins into chloroplasts [J]. *Plant Physiol*, 2009, 151: 129-141.
- [17] Jarvis P. Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants [J]. *New Phytol.*, 2008, 179: 257-285.
- [18] Agne B, Kessler F. Protein transport in organelles: the Toc complex way of preprotein import [J]. *FEBS J.*, 2009, 276: 1156-1165.
- [19] Vabulas R M, Raychaudhuri S, Hayer-Hartl M, et al. Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response [J]. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2010, 4: 4390.