

极端嗜热古菌的热休克蛋白

陈华友^{1,2}, 张春霞¹, 马晓珂¹, 张毅²

1 江苏大学生命科学研究院, 镇江 212013

2 中国科学院上海生命科学研究院, 上海 200233

摘要: 随着生物工程产业对于耐高温酶和菌体的需求, 极端嗜热古菌热休克蛋白(Heat shock proteins, HSPs)的研究更受重视, 其热休克蛋白体系非常简洁, 不含 HSP100s 和 HSP90s, 就是 HSP70(DnaK)、HSP40 (DnaJ)和 GrpE 等嗜温古菌可能含有的在极端嗜热古菌中几乎不含有, 即仅包括 HSP60、sHSP、prefoldin 和 AAA+蛋白 4 大类, 因此对其结构、功能和作用机制的研究在理论和实践上都特别有意义。系统地介绍了这 4 大类组分的结构、功能、作用机制和协同作用的研究进展, 论述了极端嗜热古菌热休克蛋白的系列研究难点和困惑, 展望了进一步的研究方向和重点。

关键词: 热休克蛋白, 极端嗜热古菌, 协同作用, 原始热聚体

Heat Shock Proteins of the Hyperthermophilic Archaea

Huayou Chen^{1,2}, Chunxia Zhang¹, Xiaoke Ma¹, and Yi Zhang²

1 Institute for Biological Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

2 Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China

Abstract: As thermostable enzymes and organisms are much more needed, researches on heat shock proteins(HSPs) of hyperthermophilic archaea have drawn more concerns. HSPs from hyperthermophilic archaea are concise only with HSP60, sHSP, prefoldin and AAA+proteins, but without HSP100s, HSP90s, HSP70 (DnaK), HSP40 (DnaJ) and GrpE which are common in mesophilic or thermophilic archaea. Accordingly, studies on the structure, function and operation mechanism of these four groups are much more important and meaningful. This review focuses on the recent progress in the researchs on the structure, function, operation mechanism and cooperation of the HSPs from hyperthermophilic archaea. The problems and obfuscations in these HSPs are analyzed, and farther research direction and key points are put out.

Keywords: heat shock proteins, hyperthermophilic archaea, cooperation, thermosome

热休克蛋白(Heat shock proteins, HSPs)是生物体对高温等外界刺激迅速作出的应激反应, 关闭正常的基因表达, 开启一组应激基因的表达, 而产生一组结构上非常保守的特殊蛋白质, 使生物体能快速、短暂调整应激过程中细胞的存活机制, 促进细胞抗损伤, 并有助于细胞恢复正常的结构和机能。

从而使生物体在热、冷、高盐、有机毒物、重金属离子、氧自由基、紫外线及缺血、缺氧、感染、基因损伤、组织创伤等不良环境和状态下生存下来。70 年代以来热休克蛋白的研究一直是个热点, 陆续发现各种热休克蛋白, 主要有分子伴侣、ATP 酶、蛋白酶、DNA 修复酶等, 大多数热休克蛋白是分子

Received: May 11, 2008; **Accepted:** September 2, 2008

Supported by: the National Basic Research Program of China (No. 2004CB719606) and Research Program of Jiangsu University (No. 08jdg011).

Corresponding author: Huayou Chen. Tel: +86-511-88797240; E-mail: hyc@ujs.edu.cn

国家重点基础研究发展计划项目(No. 2004CB719606)和江苏大学基金项目(No. 08jdg011)资助。

伴侣, 热休克蛋白常可分为 5 大类: HSP100s (80 kD~110 kD), HSP90s (82 kD~96 kD), HSP70s(67 kD~76 kD), HSP60s (58 kD~65 kD)和 sHSPs (40 kD 以下)。除了亚致死温度外, 高盐、酸、碱、乙醇等环境压力也可诱导热休克蛋白合成^[1-3]。

近年来, 对古菌热休克蛋白的研究也有了一定的进展。古菌可分为嗜温古菌(Mesophilic archaea, 30°C~60°C), 嗜热古菌 (Thermophilic archaea, 60°C~80°C), 极端嗜热古菌(Hyperthermophilic archaea, 80°C 以上)。对于极端嗜热菌, 能生活在近 100°C 的环境中, 有多种耐热机制, 但产生大量热休克蛋白是一种重要的手段。极端嗜热菌不含 HSP100s 和 HSP90s, 就是 HSP70 (DnaK)、HSP40(DnaJ)和 GrpE 等嗜温古菌可能含有的在极端嗜热菌中几乎不含有, 即仅包括 HSP60, 小分子热休克蛋白(Small heat shock protein, sHSP), 前折叠素(Prefoldin, PFD)和 AAA+蛋白 4 大类。因此对于这样的嗜高温古菌, 热休克蛋白系统反而很简化, 对其结构、功能和作用机制的研究特别有意义, 也会对其他酶和生物体的耐热研究提供理论和技术上的支持。中国科学院微

生物研究所主办的“2006 年国际极端微生物学术研讨会”上, 参会代表也强调了这些方面的观点。各类生物体所含有的热休克蛋白如表 1, 以下主要就极端嗜热古菌 4 大类热休克蛋白及其比较研究相关的亲缘热休克蛋白进行综述^[4, 5]。

1 原始热聚体

HSP60 是生物界普遍存在的热休克蛋白, 参与蛋白的折叠、复性、组装。通常分为 2 大类: 组 I HSP60, 也叫伴侣素 I (Chaperonin I), 主要是在细菌和真核生物的叶绿体、线粒体, 在一些嗜温古菌中也有。组 II HSP60, 也叫伴侣素 II (Chaperonin II), 不在一般细菌中, 而在所有的古菌中, 及在真核生物细胞质中。古菌伴侣素 II 一般是耐高温, 使菌体具有极高抗热性, 因而也叫原始热聚体 (Thermosome), 表示耐高温的意思。真核生物的伴侣素 II (T-complex polypeptide 1, TCP-1/CCT) 主要与细胞微管微丝骨架形成有关, 与原始热聚体的相似性比细菌的伴侣素 (GroE) 紧密。

表 1 不同生物的热休克蛋白
Table 1 Heat shock proteins of different organisms

HSPs	Bacteria	Eukarya	Mesophilic archaea	Thermophilic archaea	Hyperthermophilic archaea
Clp homologues (HSP100s)	+	+	+	-	-
Cdc48 and NSF homologues (AAA)	+	+	+	+	+
HSP90	+	+	-	-	-
DnaK (HSP70)	+	+	+	+	-
DnaJ	+	+	+	+	-
GrpE	+	+	+	+	-
Chaperonin (HSP60)	+	+	+	+	+
HSP33	+	+	-	-	-
HSP10(GroES)	+	+	-	-	-
sHSP	+	+	+	+	+
Prefoldin	+	+	+	+	+

1.1 分子结构

伴侣素都是由双环组成的多聚体, 而伴侣素 II 一般每环由 8 或 9 个亚基组成, 古菌伴侣素, 即原始热聚体, 亚基有一、二或三种, 其中一或二种亚基组成八聚体环(Octameric rings), 3 种不同的亚基组成九聚体环(Nonameric rings)。两组伴侣素的亚基都具有 3 种结构域组成: 顶端结构域, 上有疏水区作为蛋白识别结合部位; 赤道结构域, 拥有 ATP 结合位

点, 负责环内和环间亚基的相互作用; 中间结构域, 在 ATP 结合到环上后, 传递赤道结构域和顶端结构域的构型转变信息。8 个或 9 个亚基组成一个环, 两环背靠背紧密接触, 形成一个大分子多聚体, 两环中间各是个大的圆桶形空穴, 在这里可以进行蛋白折叠、复性。其结构如图 1。整个复合物同 GroE 多聚体的主要区别是没有结合辅助因子 GroES 覆盖在两端把底物包起来, 而是靠一个个触手(Protrusion)

连合成一个盖子, 把底物包在囊中与外界分开。2 种伴侣素分子结构中都有 2 种构型: 开放式构型, 没有核苷酸或仅是 ADP 结合上去, 对变性蛋白有较高亲和力; 关闭式构型, 结合上了 ATP, 盖子盖在伴侣素的两端, 对变性蛋白亲和力较低^[6]。

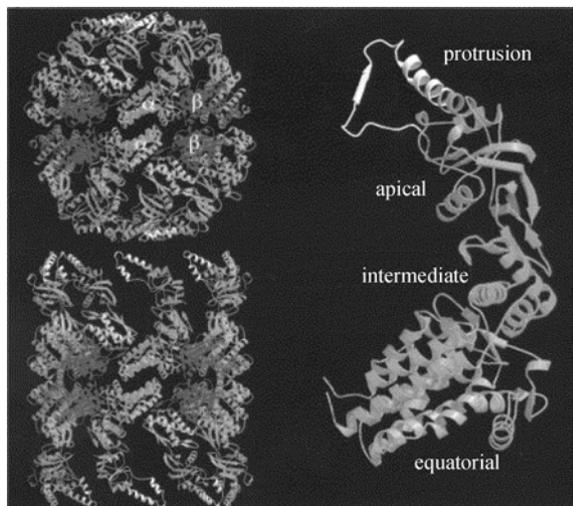


图 1 嗜酸热原体(*Thermoplasma acidophilum*)的原始热聚体^[6]

Fig. 1 Domain arrangement in the thermosome from *Thermoplasma acidophilum*

The right-hand panel shows subunit comprised by an equatorial, intermediate and apical domain; Upper-left panel is the closed thermosome; lower left panel is the open thermosome

1.2 作用机制和构型变化

伴侣素 II 的分子伴侣作用的研究没有伴侣素 I 研究得透彻, 但两者有很大的相似性, 通过 GroEL、GroES 的研究, 也可更好了解原始热聚体的作用机制, 两者作用机制的相同点和不同点可用图 2 来表示^[7-9]。

GroEL 的一个重要特点是需要 GroES 的辅助, GroES 组装成七聚体环, 作为盖子一样覆盖在 GroEL 多聚体双环两端, 从而把环内折叠穴与外界隔开, 有利于蛋白的折叠, 同时这个盖子也促进吸附在入口处的变性蛋白进入穴内。若没有 GroES, 底物没有折叠完善就从穴内跑到外面, 从而往往变性凝集, GroES 密封的空穴容纳体积是 175000Å³, 可折叠 60 kD 底物, 也有更大的蛋白可在此折叠, 到底 GroEL 怎样处理还不太清楚。也有报道 GroES 密封的空穴容纳体积是没有底物时的两倍, 要取得这样的增加, GroE 上的 3 个刚性结构域绕着 2 个铰链作较大的运转, 它们包括: 中间结构域向下移动 25°, 夹住赤道结构域的核苷酸结合位点, 顶端结构域上移 60°, 再绕着终轴顺时针转动 90°。这些结构域的运转靠 ATP 分解释放能量来驱动, 对于蛋白折叠活动来说是至关重要的, 在这一循环中, 随着 7 个 ATP 结合到带有底物的环上时, GroES 也结合到环上, 把底物释放到

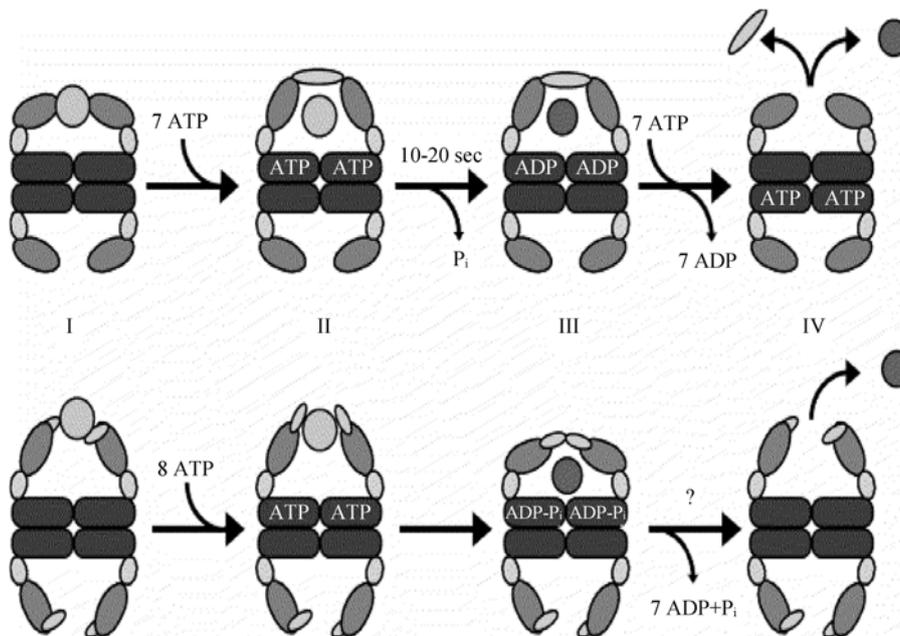


图 2 伴侣素反应循环模式图^[8]

Fig. 2 Chaperonin reaction cycles^[8]

Top panel: chaperonins I; Bottom panel: chaperonins II

折叠空穴中, 这样底物通过 GroES 同外界分开, 由于构型的转换, 空穴内由疏水的环境变成亲水的环境, 在里面底物有 10~20 s 时间进行折叠, 当 7 个 ATP 分子被分解完时 GroEL-GroES 复合物进入准备解散的构型, 当另外 7 个 ATP 结合到对面的环时(反式环), 促进 GroES 从 GroEL 分离开, 这样, 底物蛋白就释放出来。如果没有底物, 这一循环限速步骤是 GroEL-GroES 复合物的松弛, 但当有底物时, ATP 的分解速度是限速步骤^[7,8]。

那么底物是怎样被识别的呢? 对于 GroEL 和原始热聚体是靠顶端结构域上的疏水结构域同底物的疏水基团结合的, 因此原始热聚体也能对于很多来源于嗜温菌或嗜热菌的蛋白具有防凝集和复性的功能。对于真核生物伴侣素 II 情况有些不一样, 要涉及到带电和极性基团的相互作用^[9,10]。

GroEL 的体外实验表明 ATP 的结合和分解存在两个水平的协作关系, 而且不断有证据说明这协作关系在体内是很必需的, 首先 ATP 结合链内呈正协同效应, 正协同效应有利于 GroEL 作全或无的构型转变, 有利于 GroES 的结合及底物释放至折叠空穴, 因为底物和 GroEL 的多个亚基同时作用着。其次链间呈负协同效应, 也就是说 ATP 同一个环结合减少了另外 ATP 同第 2 个环的亲合力。因此 ATP 酶被描述成双动力发动机, 每个环轮流折叠蛋白底物, 就是这个负协同效应造成了这样的轮流折叠^[11,12]。这种别构效应在原始热聚体报道较少, 主要有 Kusmierczyka 等报道来自甲烷球菌(*Methanococcus maripaludis*)的原始热聚体和本文作者报道的强烈炽热球菌(*Pyrococcus furiosus*)的原始热聚体, 发现后者的双别效应更是明显式, 后者的双环分解 ATP 的速率同单环分解 ATP 的速率之比率比前者的比率更小些, 但两者都比 CCT 的比率大。对于各种原始热聚体的别构效应还需要更多的关注和研究^[2]。

伴侣素 II 同伴侣素 I 的一个重要区别是辅助分子伴侣 GroES, 伴侣素 II 是通过另外一种盖把底物包在折叠空穴内, 嗜酸热原体(*Thermoplasma acidophilum*)的原始热聚体晶体结构表明, 在顶端结构域有一个螺旋状突出, 伸向折叠空穴中心, 这在 GroEL 是没有的, 推测就是这种突出结构形成了覆盖底物的盖子(Built-in lid), 突出结构上的保守疏水基团使得该区域可以结合变性的底物, 完善的原始

热聚体晶体结构证实了突出结构可以关闭折叠空穴^[4], 有趣的是晶体结构分析表明突出结构在独立的顶端结构域中是螺旋结构, 在形成盖子封闭折叠空穴时采用 β 折叠构型。综合晶体结构和电子显微技术, 可以得到图 2 的作用模式^[8,13]。

在一种开放式构型中, 突出结构面向外面, 对底物亲和力和高, 暴露的疏水基团吸附变性蛋白, 另外一种封闭式构型中, 突出结构形成盖子, 封闭折叠空穴, 把底物装入空穴, 按照底物自身氨基酸序列所带有的信息进行折叠^[10]。把底物隔离在折叠空穴, 可以消除一些降低产量的副作用, 如凝聚沉淀, 从而可以提高产量。伴侣素 II 关闭时的空穴容积是 $130\ 000\ \text{\AA}^3$, 可以让 50 kD 蛋白完全封闭在空穴内^[14]。

1.3 生物学应用

1.3.1 对蛋白质复性的作用

在大多数实验中, 原始热聚体与解折叠蛋白的相互作用是依靠对变性蛋白自发复性的抑制而推测的, 几乎所有进行实验的变性的底物都可与原始热聚体作用而减少沉淀产生, 也抑制了相应的自发复性, 然而一些原始热聚体需要超过底物较多的量才能完全捕获全部底物, 极端的例子如詹氏甲烷球菌(*Methanococcus jannaschii*)的原始热聚体要 500 倍于底物才能完全捕获待复性的全部底物, 这样低的效率可能是没有达到原始热聚体的生理功能温度的原因, 因为这些模型底物都是常温蛋白^[6]。原始热聚体作为分子伴侣应不仅仅是捕获自发复性蛋白, 其真正的任务是促进正确的复性折叠, 提高正确复性蛋白的产量, 当然一般也要消耗 ATP, 然而, 至今来源于詹氏甲烷球菌, 甲烷嗜热菌(*Methanopyrus kandleri*), 嗜酸热原体, 隐蔽热网菌(*Pyrodictium occultum*)和硫化菌 *Sulfolobus* sp. strain 7 的原始热聚体仅仅是同目标蛋白形成牢固的复合体, 但不能释放这个蛋白, 即使已加了足够的 Mg-ATP。就是硫化菌 *Sulfolobus* sp. strain 7 的原始热聚体在 60°C~68°C 下也不能释放嗜热底物。当然, 对于甲烷嗜热菌原始热聚体存在的一个问题是它需要 1 mol/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 才能有较强的活性, 但是在实验中这么高的盐浓度会抑制原始热聚体对底物的抗凝集作用。而且, 热球菌(*Thermococcus* strain KS1)的 α -原始热聚体虽然能抑制嗜热的异柠檬酸脱氢酶的自发复性, 但是底物只是部分被 Mg-ATP 释放出来, 令人惊奇的是底物复

性的产量比没有原始热聚体的自发复性要低。出乎意料的是它的重组 β -亚基的非天然聚合体在 Mg-ATP 存在下竟能提高这个底物的产量, 难道伴侣素的不同结构形式也有一定的功能? 当然也有报道, 嗜热无机营养甲烷球菌(*Methanococcus thermolithotrophicus*)和硫磺矿硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)的原始热聚体在有 ATP 的条件下, 都能提高目标蛋白的复性产量^[6]。极端嗜热火球菌(*Pyrococcus horikoshii* OT3)的伴侣素在有 ATP 的情况下能提高酸变性 GFP 的复性产量^[15]。最近, Bergeron LM 等报道詹氏甲烷球菌(*Methanocaldococcus jannaschii*)的原始热聚体可以减少猪心柠檬酸合成酶在乙腈有机溶剂下的凝集, 并对其复性有一定的作用, 即使没有 ATP 条件下的, 也能对其有复性作用, 不过略低于有 ATP 的条件下, 但是没有 ATP 的条件下 GroE 对其却没有一点复性功能。同时首次指出协助这些复性功能时, 原始热聚体的 N 端 70 个氨基酸是必需的, 尽管 N 端不是变性蛋白结合也不是 ATP 分解的关键区^[16,17]。因此, 这些发现是否在其他原始热聚体有一定的普遍性, 及哪些氨基酸对这些功能有直接的作用, 原始热聚体和 ATP 到底需不需要一起作用, 原始热聚体的复性功能和机制还需要再进一步深入的研究。

1.3.2 防止蛋白热变性

大多数古菌的原始热聚体有能力保护底物免受热变性, 防止热诱导的底物凝集。虽然硫磺矿硫化叶菌原始热聚体不能防止来自于同种嗜热菌底物的 90°C 热失活, 但在 50°C、加 ATP 的情况下可恢复活性。而且, 几乎全部古菌原始热聚体都能保护它们的底物免受热凝集, 总的来说可分为 4 大类^[6,15]。

第 1 类, 代表是甲烷嗜热菌、隐蔽热网菌及极端嗜热火球菌(*Pyrococcus horikoshii*)的原始热聚体, 通过光散射检测底物沉淀的减少, 没有监测底物的活性变化。

第 2 类, 代表是硫磺矿硫化叶菌的原始热聚体, 在 70°C 时能抑制溶菌酶的凝集, 在 40°C 能抑制酵母 α 葡萄糖苷酶的凝集, 但是不能防止活性的丧失, 然而, 加入 ATP 后, 底物的活性可部分恢复, 也就是说 ATP 促进活性的重新获得。

第 3 类, 代表是硫磺矿硫化叶菌原始热聚体和一火球菌 *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1 的 β -原始

热聚体, 对于嗜温性四聚体底物酵母酒精脱氢酶和小鸡肝苹果酸酶, 它们结合在原始热聚体的外面, 同 ATP 的结合和分解无关, 而且不影响单聚体底物同其中央空穴结合, 如果原始热聚体的底物结合特点真得被这些实验所反映, 那么试验原始热聚体到底怎样同寡聚体相互作用将是一个很有见识性的实验, 对单聚体和多聚体底物同原始热聚体有特定的结合区域的假说产生挑战。有趣的是这些结果没有在甲烷嗜热菌原始热聚体得到重复。不过, 最近 Kohda J 等报道 *Thermococcus* strain KS-1 的原始热聚体对酵母乙醇脱氢酶等有一定的抗热保护作用, 尽管在没有 ATP 的情况下^[18]。

第 4 类, 代表是强烈炽热球菌的原始热聚体, 本文作者最近报道, 在有 14 mmol/L ATP、0.72 mg/mL 强烈炽热球菌的原始热聚体下, 溶菌酶在 90°C 加热 140 min, 能有 69% 的活性保留着, 约是对照组的 3 倍, 而没有 ATP 情况下则没有一点保护功能, 说明原始热聚体在有 ATP 的情况下可以较好地提高溶菌酶的热稳定性^[2]。Laksanalamai 等也报道过强烈炽热球菌的原始热聚体在有 ATP 情况下能较好地提高 Taq DNA 聚合酶的热稳定性^[19]。

跟据这些年的研究表明, 原始热聚体的抗热性功能还有很多的困惑和不一致之处, 其抗热性机理和特点有待于进一步的研究、比较和总结。

1.3.3 在体内作用的研究

原始热聚体在体内到底有哪些合适的底物还不太清楚, 也不知道原始热聚体在体内是否在非压力状态下也对那些特殊的底物进行作用, 如同 TriC 对微管微丝的重要作用一样。很少有报道原始热聚体在体内的具体作用情况, 只是来自 *P. kodakaraensis* KOD1 的一个蛋白 cobyrinic acid synthase (cobQ) 在大肠杆菌中以包涵体形式表达, 但和该同种的 α 或 β 原始热聚体共表达时, 能形成可溶性表达, 虽然这是在大肠杆菌环境中, 但还是提供了一些证据说明同源寡聚体原始热聚体的一些功能。当然, 只有得到原始热聚体的天然底物, 才能较为透彻地了解原始热聚体不同亚基的重要性。有趣的是 α 或 β 原始热聚体的 ATP 酶活性突变体也能防止 cobQ 的凝集, 似乎说明 ATP 分解同原始热聚体的底物复性有关, 同抗凝集不太有关^[20,21]。总之, 原始热聚体的体内作用报道的太少, 有待于进一步的

研究和关注。

1.3.4 其他方面作用

除了蛋白折叠功能外, 伴侣素的双环结构已被观察到能在体外自发组装成纤丝结构, 也有证据表明在体内也可组装成这样的纤丝结构, 纤丝结构的产生说明伴侣素的双环结构不是唯一的一种结构, 伴侣素除了蛋白折叠功能外在不同细胞不同个体可能有多种功能。Georgellis 等发现还有 mRNA 的稳定作用, Ruggero 等发现还有参与核糖体基因翻译的功能, Trent 和 Török 等发现还有稳定膜的作用^[22,23]。

2 小分子热休克蛋白

小热休克蛋白在古菌中是普遍存在的, 与真核生物的 α 晶体蛋白相似。尽管 sHSP 无论在 N 端还是在 C 端氨基酸序列和长度差异较大, 分子量 10~41 D, 但是它们的中段 α 晶体(α -crystallin)序列比较相似, 特别在链的长度和结构上比较相近, 都有结实的如三明治的 β -折叠, 象免疫球蛋白的折叠一样, α 晶体(α -crystallin)是二聚体形成必不可少的, 这些二聚体是多聚体的基本结构, 其两侧翼区促进了更高级结构的形成。有证据说明它们都是分子伴侣, 古菌中已鉴定的小热休克蛋白限于几个嗜温和极端嗜热菌中, 各基因组中 sHSP 的同聚体基因数目是不同的, 大多数极端嗜热菌拥有 1-2 个 sHSP 的同聚体, 但好氧火棒菌(*Pyrobaculum aerophilum*)有 3 个已被鉴定^[24-28]。然而很多植物有 10 多个 sHSP 的同聚体, 分布在不同的组织, 不同的细胞间隔中^[29]。很多 sHSPs 形成寡聚体, 分子量为 200 kD 到 1000 kD 不等。X 衍射晶体结构研究表明, 詹氏甲烷球菌和发光古球菌(*Archaeoglobus fulgidus*)的 sHSP 形成中空的球形结构 24 聚体, 在体外有分子伴侣活性^[26,30,31], 但小麦(wheat)的 sHSP 是形成桶状的 12 聚体, 由 2 个六聚体双环结构组成^[32], 对于强烈炽热球菌的 sHSP, 亚基相互作用是 sHSP 分子伴侣功能的重要前提。Haslbeck M 等^[26]指出 sHSPs 在较低温度时, 例如 50°C 以下, 以球形 24 聚体为主, 向较高温度过渡时, 会聚集成较大的团聚体, 在 60°C 以上时几乎是大的团聚体, 这主要是因为 sHSPs 在高温下空间构象发生改变, 疏水区暴露在外, 从而聚集成更大的团聚体, 或者 24 聚体在高温下分解成小的寡聚体, 好多疏水区暴露在外, 从而进一步聚集。在疏水区暴露

时, sHSP 的二级结构是没有变化的, 这些暴露疏水区可以和一些变性的底物蛋白结合, 从而防止其沉淀。这种高温下诱导结构重排, 从而提高其分子伴侣活性, 防止变性蛋白沉淀的现象可能在嗜热菌中是普遍的。

除个别外, 大多数 sHSPs 在没有其他因素的帮助下不能使变性蛋白复性, 但可以通过和变性的蛋白结合, 防止其凝集沉淀。来自极端嗜热菌的 sHSPs 能维持蛋白在 100°C 多呈溶解状态^[27,33]。有趣的是许多 sHSPs 在生理温度和状态下往往没有活性或只有部分活性。sHSPs 结合的底物蛋白的释放一般需要 ATP 的参与, 在整个热休克蛋白体系中, sHSPs 创造了变性蛋白的蓄水池, 便于其他分子伴侣进一步的复性^[26]。例如, 聚球藻(*Synechococcus vulcanus*)和结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)sHSPs 能够各自防止柠檬酸合成酶和苹果酸脱氢酶的热凝集, 但不能使酶活性恢复^[34,35], 同样, 强烈炽热球菌的 sHSP 防止牛谷氨酸脱氢酶凝集, 而没有复性功能^[27,28]。尽管似乎 sHSPs 不能复性大多数变性的蛋白, 但 α 晶体蛋白还是可以复性一些蛋白的。高浓度的嗜热古球菌(*Thermococcus* sp. KS-1) sHSP 能复性化学变性的 GFP 蛋白, 不需要 ATP 参与^[36]。本文作者最近报道强烈炽热球菌的 sHSP 能够提高 Taq DNA 聚合酶在扩增时的热稳定性, 也能够提高 DNA 限制性内切酶 Hind III 和溶菌酶的热稳定性, 这些显然是高温下的复性能力, 这些作用不必有 ATP 的参与^[37], Laksanalamai 等也报道过强烈炽热球菌的 sHSP 能够提高 Taq DNA 聚合酶在扩增时的热稳定性^[19]。来自豌豆(*Pisum sativum*)的 sHSP 也能使化学变性的柠檬酸合成酶和乳酸脱氢酶复性, 不需要 ATP 参与^[38]。在相似的实验, 人 α , β 晶体蛋白能使化学变性的柠檬酸合成酶复性, 若加入 3.5 mmol/L ATP, 能使复性产量提高 2 倍, 尽管 ATP 分解没有被观察到^[39]。尽管 α 晶体蛋白和 sHSPs 有同样的作用机制, 但真正的作用方式还没有搞清楚, 作用方式到底需不需要 ATP 参与还无一致的结论。

很多真核生物和真细菌的 sHSPs 和其他分子伴侣的协同作用被报道过, 植物的 sHSPs 能够防止温度变性的蛋白凝集, 随后被 HSP70 系统分子伴侣复性, 也要消耗 ATP^[40,41]。可以想象, 在古菌中, 蛋白

的折叠, 亚基的组装需要多种分子伴侣的协作, 详细的内容还需进一步的研究。强烈炽热球菌的 sHSP 和伴侣素的协同作用规律至今还没有报道过, 本文作者及研究团队也正在研究其 sHSP 和伴侣素的协同作用规律。

3 前折叠素

前折叠素是一种和伴侣素协同作用的辅助伴侣, 真核生物的前折叠素参与肌动蛋白和微管蛋白的成熟, 通过把不完全折叠常态的蛋白传递给 CCT。破坏酵母编码前折叠素亚基的基因, 将减少微管微丝骨架蛋白的水平^[42]。虽然在古菌内没有肌动蛋白和微管蛋白, 前折叠素多聚体也几乎在所有的种类都存在^[42,43]。嗜热自养甲烷杆菌 *Methanobacterium thermoautotrophicum* 前折叠素的晶体结构已被鉴定, 分辨率达 2.3 埃, 它的形态象水母, 由 2 个 β 折叠桶构成, 6 个长长的圈曲的触手伸展到外面, 触手顶端露出疏水区域, 有证据表明, 圈曲是变性的蛋白多价结合所要求的^[44]。

真核生物前折叠素拥有同古菌一样的结构, 也用这 6 个触手捕获底物。在前折叠素和肌动蛋白的复合体的三维结构分析中, 肌动蛋白似乎和前折叠素的圈曲触手的顶端部位作用。通过电子显微镜实验观察前折叠素-CCT 复合物表明前折叠素的触手顶端是同伴侣素的顶端结构域的内面作用的^[45]。有证据说明微管微丝底物和前折叠素的不相同但重叠的顶端部位相互作用^[46]。相比, 古菌前折叠素和分子伴侣的相互作用的报道较少, 但是古菌是一个好的模型系统, 探索它们的相互作用, 因为其亚基组成简单, 结构稳定。Mina Okochi 等报道极端嗜热火球菌(*Pyrococcus horikoshii* OT3)的前折叠素呈六聚体($\alpha 2\beta 4$), 能保护猪心柠檬酸合成酶免受热凝集。前折叠素和伴侣素共同作用绿色荧光素蛋白(GFP), 不但把 GFP 传递给伴侣素 II, 而且也传递给伴侣素 I 进行折叠、复性。通过免疫沉淀、单分子观察、表面等离子共振等方法, 鉴定底物和伴侣素同前折叠素的结合部位, 发现前折叠素的 β 亚基顶端的 N 端和 C 端区都是底物结合的重要位置, 也是同伴侣素相互作用的位置。前折叠素顶端这一双功能结合区域更好地与伴侣素进行协同作用^[47]。Tamotsu Zako

等也报道在折叠和解折叠的中间态下, 底物同极端嗜热火球菌的前折叠素的结合和释放呈动态平衡, 而伴侣素有利于底物从前折叠素释放出来^[48]。Mina Okochi 等^[49]也报道极端嗜热火球菌的前折叠素和伴侣素能协同作用提高化学变性的来自嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus* strain HB8)的 3-Isopropylmalate dehydrogenase (IPMDH)的复性产量。最近二年报道了极端嗜热火球菌的前折叠素, 其晶体结构分辨率达 3 埃, 以及对詹氏甲烷球菌和 *Thermococcus* sp. Strain KS-1 的前折叠素分析表明这些古菌的前折叠素的分子结构同嗜热自养甲烷杆菌的前折叠素比较相似, 在前折叠素和变性蛋白的作用机理上有了较大的进展, 指出 β 亚基圈曲的触手顶端疏水区是结合变性蛋白所必需的, α 亚基调整中央空穴的形状和宽度, 突变试验表明 β 亚基 107 号的 Ile 是疏水区的关键残基^[43,50,51]。

Tamotsu Zako 等^[52]研究表明热球菌 β 伴侣素及极端嗜热火球菌伴侣素的 250 号 Glu 和 256 号 Glu 是同前折叠素结合的关键残基, 前折叠素的触须末端是以碱性残基为主, 变性蛋白底物从前折叠素传到伴侣素和两者的亲和力很有关系。并作了前折叠素和伴侣素相互作用的示意图, 如图 3, 第一步是 dGFP-PFD 和开放的伴侣素靠静电作用力结合; 第二步是 dGFP 从前折叠素释放出来同伴侣素结合, 第三步是前折叠素从伴侣素释放出来。随后是 ATP 的结合, 导致伴侣素构象转变而关闭, 变性蛋白在关闭的空穴中进行折叠复性, 随着 ATP 的水解和 γ 磷酸根的释放, 导致盖子打开, 底物的释放。总的来说, 近年前折叠素研究有了较大的进展, 但象伴侣素释放前折叠素的机制等还需要进一步的研究, 这些协同作用在体内的详细过程还需要进一步的研究。本研究团队最近已首次成功克隆并表达了强烈炽热球菌的二个前折叠素基因, 发现大肠杆菌表达前折叠素能明显提高其 50°C 热环境的成活率。并纯化得到了表达纯品, 将进一步研究同其原始热聚体的协同作用规律, 同时已在进行强烈炽热球菌原始热聚体的突变体研究, 也拟作其前折叠素的突变体研究, 进一步探索原始热聚体利用 ATP 和提高蛋白抗热性的作用机制, 及原始热聚体释放前折叠素的机制。

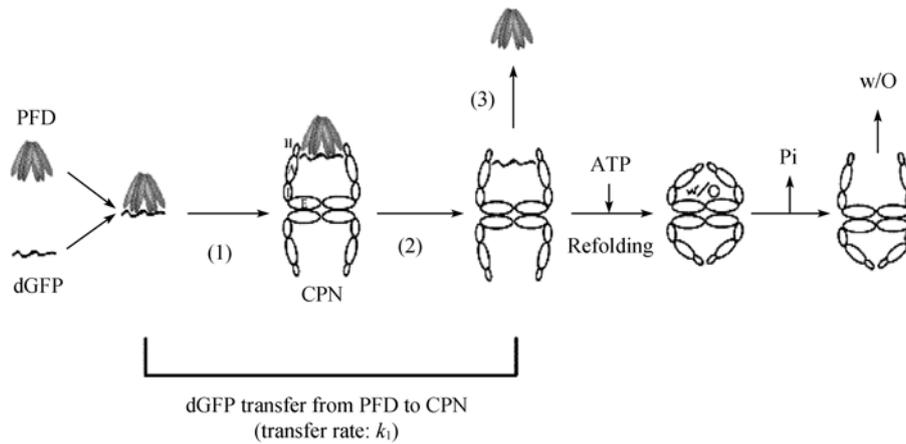


图 3 底物 dGFP 从前折叠素传到组 II 伴侣素的示意图^[52]

Fig. 3 Schematic model for the substrate protein transfer mechanism from prefoldin to group II chaperonins

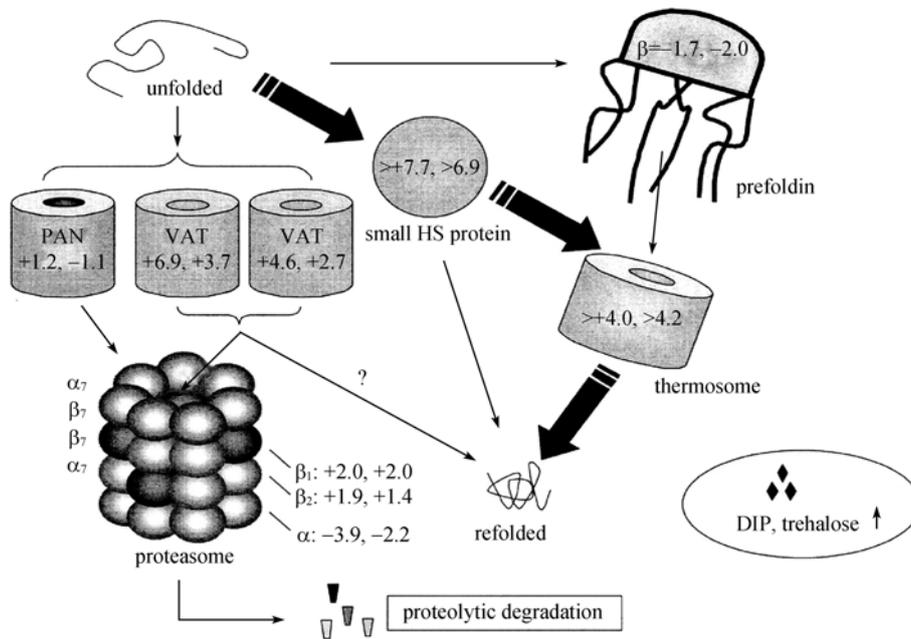


图 4 强烈耐热球菌的热休克蛋白协同作用示意图^[58]

Fig. 4 Cooperation of the heat shock proteins from *Pyrococcus furiosus*^[58]

4 AAA+蛋白

AAA+蛋白家族具有 ATP 酶活性, 具有各种的细胞功能活性, 有 3 个结构域, 其中一个或二个是 ATP 酶活性的保守区域, 大约 230~250 个氨基酸, 包括 AAA 盒。AAA+蛋白在古菌中存在较多, 很少在真核生物中发现。AAA+蛋白能够促进膜的融合, 核酸的解折叠, 蛋白质折叠和降解。AAA+蛋白往往和其他蛋白酶或分子伴侣合作, 控制蛋白体系的质量。也为很多细胞活动提供能量, 例如 DNA 复制、重组、细胞分裂增殖、孢子形成等。在极端嗜热菌

中, CDC48 和 NSF 类聚体是重要的 AAA+蛋白。研究得较多的为嗜酸热原体含缬酪肽蛋白样三磷酸腺苷酶[valosin-containing protein (VCP)-like ATPase from *Thermoplasma acidophilum*, VAT], 属于二型 AAA 三磷酸腺苷酶, VAT 单体有三重结构域: N-D1-D2, N 结构域用来结合底物, 这 N 结构域又分为 N 端 β 折叠桶亚结构域和 C 端 β 折叠片层亚结构域, D1、D2 结构域都包含有 AAA 盒。VAT 单体形成直径 19.1 nm 的环形六聚体, 其核心部分直径 13.2 nm, 高为 8.4 nm, VAT 复合体六边形角的电子密度较中心密, 标志着中心空穴的存在, 空穴宽度为 6 nm, N 结构域位于

六聚体环的上端外测, VAT 在细胞中的具体作用现在还不清楚。最近 SummerH 等报道的发光古球菌的 AAA+蛋白, 属 CDC48 家属, 形成环形的六聚体, 直径为 125Å, 可以结合并分解 ATP, 在 86°C ATPase 最稳定活性最大, 但这些 AAA+蛋白的具体作用还不太清楚。总得来说关于极端嗜热菌的 AAA+蛋白家族报道太少, 其结构功能和协同作用等方面都需要进一步的研究^[53-56]。

5 各种热休克蛋白的协同作用

极端嗜热菌适应生活在近 100°C 的高温中, 有较多的适应高温的机制, 紧凑简洁的基因组可能更使菌体可以生活在很高的温度下, 因此, 简化的热休克蛋白体系也可能是高温诱导简化的结果^[57]。尽管热休克蛋白体系简化了许多, 但各成员之间还可能是紧密联系协同作用的, 如图 4, 在极高温等不良环境下, 解折叠的蛋白可受到 sHSP 或前折叠素的保护而不发生凝集沉淀, 前折叠素可把待复性的中间态蛋白进一步传递给原始热聚体进行复性。sHSP 可把待复性的中间态蛋白释放而小部分折叠到天然蛋白, 也可把待复性的中间态蛋白传递给原始热聚体而进一步复性。变性解折叠的蛋白可能通 VAT 等 AAA 蛋白折叠成正常的有活性的蛋白, 也可能通过 VAT 等 AAA 蛋白和一些蛋白酶降解成氨基酸或小肽^[58]。以上只是一种推测, 具体证明报道较少, 本研究团队正在研究强烈炽热球菌的 sHSP, 前折叠素和原始热聚体的体外协同作用规律, 但是特别是在极端嗜热菌体内的研究其相互协同作用的机制报道几乎没有, 目前也没有迹象表明有人在研究。

6 展望

随着人们对于耐高温的酶和生物体的需求, 对于极端嗜热菌热休克蛋白的研究将更为重视, 从而需要更为深刻地了解蛋白和菌体的耐热机制, 了解蛋白的相互作用规律, 特别是了解热休克蛋白协同作用规律。随着生物工程技术的发展, 极端嗜热菌热休克蛋白的一系列难题和困惑将会需要和得到进一步的解决, 例如, 原始热聚体利用 ATP 对变性蛋白复性的详细机制和过程需要进一步的了解, 不同的极端微生物原始热聚体在复性和保护其它蛋白时到底需不需要 ATP 的参与, 是否可进一步分类, 因

此通过定点突变等技术在赤道结构域 ATP 结合位点寻找同 ATP 作用的氨基酸残基, 以及原始热聚体高分辨率晶体结构的分析都是今后的主要研究方向之一; 不同的极端微生物的原始热聚体是否都有别构效应, 在什么情况下别构效应较明显, 同环内亚基之间是如何传递信息对 ATP 的结合呈全或无的正协同作用, 环间 ATP 的结合是如何被暂时抑制的; 不同的离子及浓度对其 ATP 酶和分子伴侣活性有何影响, 是否有一定的类别可分, 本文作者对强烈炽热球菌的原始热聚体的 ATPase 的作用条件作了详细的研究, 具体内容待发表中; 原始热聚体在体外的试验较多, 有些功能不明显或同其它原始热聚体相比有矛盾, 不同极端菌的生存环境的不同, 是不是需要一些另外因素补充参与, 是不是在体外缺少了菌体内一些因素的参与。对于单一的 sHSP 在体外的抗热性还没有统一观点, 到底需不需 ATP 的参与还没有一致的看法, 或者体外的试验同体内环境也相差很大; sHSP 多聚体的形成和变化规律还了解不多, 对蛋白的抗沉淀以及复性的机制了解并不多。极端嗜热菌前折叠素的研究近年有了一定的进展, 但同原始热聚体分离等机制还需进一步研究, 因此, 对原始热聚体亚基的顶端结构域的触手区和前折叠素的 β 亚基顶端的 N 端和 C 端区的氨基酸残基进行定点突变可能会有利于探索相互作用的规律, 本研究团队下一阶段将会进行这方面的研究。极端微生物 AAA+蛋白的结构和功能现在都知之甚少。总的来说, 这 4 大类组分都需要进一步研究, 特别是极端嗜热菌热休克蛋白系统自身各蛋白协同作用及和菌体内其他因素的共同抗逆作用更需要了解, 本研究团队正在进行强烈炽热球菌的 sHSP, 前折叠素和原始热聚体的体外协同作用规律。尽管国内外现在极端嗜热菌热休克蛋白在嗜热菌体内的功能和作用规律还似乎没人进行, 但随着生物工程技术的进一步发展, 在极端菌上进行热休克蛋白基因敲除、整合、定点突变等操作是必然的方向, 从而真正地在体内水平上了解热休克蛋白体系的作用规律。

REFERENCES

- [1] Trent JD, Gabrielsen M, Jensen B, *et al.* Acquired thermotolerance and heat shock proteins in thermophiles from the three phylogenetic domains. *J Bacteriol*, 1994, **176**: 6148-6152.

- [2] Chen HY, Chu ZM, Zhang Y, *et al.* Expression and characterization of the chaperonin molecular machine from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Basic Microb*, 2007, **47**: 132–137.
- [3] Fareleira P. Response of a strict anaerobe to oxygen: survival strategies in *Desulfovibrio gigas*. *Microbiology*, 2003, **149**: 1513–1522.
- [4] Laksanalamai P, Whitehead TA, Robb FT. Minimal protein-folding systems in hyperthermophilic archaea. *APRIL*, 2004, **2**: 315–324.
- [5] Shockley KR, Ward DE, Chhabra SR, *et al.* Heat shock response by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microb*, 2003, 2365–2371.
- [6] Gutsche I, Essen LO, Baumeister W. Group II chaperonins: new TRiC(k)s and turns of a protein folding machine. *J Mol Biol*, 1999, **293**(2): 295–312.
- [7] Krishna KA, Rao GV, Rao KR. Chaperonin GroEL: structure and reaction cycle. *Curr Protein Pept Sci*, 2007, **8**(5): 418–425.
- [8] Kusmierczyk AR, Martin J. Chaperonins – keeping a lid on folding proteins. *FEBS Letters*, 2001, **505**(3): 343–347.
- [9] Bigotti MG, Bellamy SRW, Clarke AR. The Asymmetric ATPase cycle of the thermosome: Elucidation of the binding, hydrolysis and product-release steps. *J Mol Biol*, 2006, **362**: 835–843.
- [10] Gómez-Puertas P, Martín-Benito J, Carrascosa JL, *et al.* The substrate recognition mechanisms in Chaperonins. *J Mol Recognit*, 2004, **17**: 85–94.
- [11] Farr GW, Furtak K, Rowland MB, *et al.* Multivalent binding of nonnative substrate proteins by the chaperonin GroEL. *Cell*, 2000, **100**: 561–573.
- [12] Yifrach O, Horovitz A. Coupling between protein folding and allostery in the GroE chaperonin system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 1521–1524.
- [13] Horwich AL, Fenton WA, Chapman E, *et al.* Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, **23**: 115–145.
- [14] Ditzel L, Lowe J, Stock D, *et al.* Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT. *Cell*, 1998, **93**: 125–138.
- [15] Okochi M, Matsuzaki H, Nomura T, *et al.* Molecular characterization of the group II chaperonin from the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Extremophiles*, 2005, **9**: 127–134.
- [16] Bergeron LM, Lee C, Tokatlian T, *et al.* Chaperone function in organic co-solvents: Experimental characterization and modeling of a hyperthermophilic chaperone subunit from *Methanocaldococcus jannaschii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, **1784**: 368–378.
- [17] Bergeron LM, Lee C, Clark DS. Identification of a critical chaperoning region on an archaeal recombinant thermosome. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **369**: 707–711.
- [18] Kohda J, Kawanishi H, Suehara KI, *et al.* Stabilization of free and immobilized enzymes using hyperthermophilic chaperonin. *J Biosci Bioeng*, 2006, **101**(2): 131–136.
- [19] Laksanalamai P, Pavlov AR, Slesarev AI, *et al.* Stabilization of Taq DNA polymerase at high temperature by protein folding pathways from a hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnol Bioeng*, 2006, **93**(1): 1–5.
- [20] Yan Z, Fujiwara S, Kohda K, *et al.* *In vitro* stabilization and *in vivo* solubilization of foreign proteins by the beta subunit of a chaperonin from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. strain KOD1. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 785–789.
- [21] Izumi M, Fujiwara S, Takagi M, *et al.* Isolation and characterization of a second subunit of molecular chaperonin from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1: analysis of an ATPase deficient mutant protein. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 1801–1805.
- [22] Trent JD. Extremophiles in Astrobiology: *Per Ardua ad Astra*. *Gravitational Space Biol Bull*, 2000, **13**: 5–11.
- [23] Martin J. Chaperonin function—effects of crowding and confinement. *J Mol Recognit*, 2004, **17**: 465–472.
- [24] Laksanalamai P, Robb FT. Small heat shock protein from extremophiles: a review. *Extremophiles*, 2004, **8**: 1–11.
- [25] Sun Y, MacRae TH. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell Mol Life Sci*, 2005, **62**: 2460–2476.
- [26] Martin H, Kastenmüller A, Buchner J, *et al.* Structural dynamics of archaeal small heat shock proteins. *J Mol Biol*, 2008, **378**: 362–374.
- [27] Laksanalamai P, Maeder DL, Robb FT. Regulation and mechanism of action of the small heat shock protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol*, 2000, **183**: 5198–5202.
- [28] Laksanalamai P, Jiemjit A, Bu Z, *et al.* Multi-subunit assembly of the *Pyrococcus furiosus* small heat shock protein is essential for cellular protection at high temperature. *Extremophiles*, 2003, **7**: 79–83.
- [29] Sun W, Van Montagu M, Verbruggen N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1577**: 1–9.
- [30] Kim KK, Kim R, Im SH. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature*, 1998, **394**: 595–599.
- [31] Kim DR, Lee I, Ha SC. Activation mechanism of HSP16.5 from *Methanococcus jannaschii*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **307**: 991–998.
- [32] Van Montfort RL, Basha E, Friedrich KL, *et al.* Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nature Struct Biol*, 2001, **8**: 1025–1030.
- [33] Kim R, Kim KK, Yokota H, *et al.* Small heat shock protein of *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 9129–9133.
- [34] Roy SK, Hiyama T, Nakamoto H. Purification and characterization of the 16 kD heat-shock-responsive protein from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*, which is an α -crystallin-related, small heat shock protein. *Eur J Biochem*, 1999, **262**: 406–416.
- [35] Chang Z, Primm TP, Jakana J, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* 16 kD antigen (HSP16.3) functions as an oli-

- gomic structure *in vitro* to suppress thermal aggregation. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 7218–7223.
- [36] Usui K, Yoshida T, Maruyama T, *et al.* Small heat shock protein of a hyperthermophilic archaeum, *Thermococcus* sp. strain KS-1, exists as a spherical 24-mer and its expression is highly induced under heat-stress conditions. *J Biosci Bioeng*, 2001, **92**(2): 161–166.
- [37] Chen HY, Chu ZM, Zhang Y, *et al.* Over-expression and characterization of the recombinant small heat shock protein from *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnol Lett*, 2006, **28**: 1089–1094.
- [38] Lee GJ, Pokala N, Vierling E. Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 10432–10438.
- [39] Muchowski PJ, Clark JI. ATP-enhanced molecular chaperone functions of the small heat shock protein human B crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 1004–1009.
- [40] Siegers K, Bölter B, Schwarz JP, *et al.* TRiC/CCT cooperates with different upstream chaperones in the folding of distinct protein classes. *EMBO J*, 2003, **22**: 5230–5240.
- [41] Lee GJ, Vierling EA. Small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol*, 2000, **122**: 189–198.
- [42] Geissler S, Siegers K, Schiebel E. A novel protein complex promoting formation of functional alpha- and gamma-tubulin. *EMBO J*, 1998, **17**: 952–966.
- [43] Whitehead TA, Oonyaratanakornkit BB, Hollrigl V, *et al.* A filamentous molecular chaperone of the prefoldin family from the deep-sea hyperthermophile *Methanocaldococcus jannaschii*. *Protein Sci*, 2007, **16**: 626–634.
- [44] Siegert R, Leroux MR, Scheufler C, *et al.* Moarefi I. Structure of the molecular chaperone prefoldin. Unique interaction of multiple coiled coil tentacles with unfolded proteins. *Cell*, 2000, **103**(4): 621–632.
- [45] Martin-Benito J, Boskovic J, Gomez-Puertas P, *et al.* Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT. *EMBO J*, 2002, **21**: 6377–6386.
- [46] Simons CT, Staes A, Rommelaere H, *et al.* Selective contribution of eukaryotic prefoldin subunits to actin and tubulin binding. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 4196–4203.
- [47] Okochi M, Nomura T, Zako T, *et al.* Kinetics and binding sites for interaction of the prefoldin with a group II chaperonin. *J Biol Chem*, 2004, **279**(30): 31788–31795.
- [48] Zako T, Iizuka R, Okochi M, *et al.* Facilitated release of substrate protein from prefoldin by chaperonin. *FEBS Letters*, 2005, **579**: 3718–3724.
- [49] Okochi M, Matsuzaki H, Nomura T, *et al.* Molecular characterization of the group II chaperonin from the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Extremophiles*, 2005, **9**: 127–134.
- [50] Ohtaki A, Kida H, Miyata Y, *et al.* Structure and molecular dynamics simulation of archaeal prefoldin: the molecular mechanism for binding and recognition of nonnative substrate proteins. *J Mol Biol*, 2008, **376**: 1130–1141.
- [51] Iizuka R, Sugano Y, Ide N, *et al.* Functional characterization of recombinant prefoldin complexes from a hyperthermophilic archaeon, *thermococcus* sp. strain KS-1. *J Mol Biol*, 2008, **377**: 972–983.
- [52] Zako T, Murase Y, Iizuka R, *et al.* Localization of prefoldin interaction sites in the hyperthermophilic group II chaperonin and correlations between binding rate and protein transfer rate. *J Mol Biol*, 2006, **364**: 110–120.
- [53] Summer H, Bruderer R, Weber-Ban E. Characterization of a new AAA+ protein from archaea. *J Struct Biol*, 2006, **156**: 120–129.
- [54] Davey MJ, Jeruzalmi D, Kuriyan J, *et al.* Motors and switches: AAA+ machines within the replisome. *Nature Rev Mol Cell Bio*, 2002, **3**: 826–835.
- [55] Shih CJ, Lai MC. Analysis of the AAA+ chaperone clpB gene and stress-response expression in the halophilic methanogenic archaeon *Methanohalophilus portucalensis*. *Microbiology*, 2007, **153**: 2572–2583.
- [56] Rockel B, Jakana J, Chiu W, *et al.* Electron cryo-microscopy of VAT, the Archaeal p97/CDC48 homologue from *Thermoplasma acidophilum*. *J Mol Biol*, 2002, **317**: 673–681.
- [57] Forterre P, Philippe H. The last universal common ancestor (LUCA), simple or complex? *Biol Bull*, 1999, **196**: 373–375.
- [58] Shockley KR, Ward DE, Chhabra SR, *et al.* Heat shock response by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microb*, 2003, **69**: 2365–2371.