

组织转谷氨酰胺酶与神经退行性疾病

余小菁^{1,2} 周嘉伟^{1*} 袁崇刚^{2*}

¹中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031;

²华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要 组织转谷氨酰胺酶(tissue transglutaminase, tTG)广泛分布于各种组织及细胞中, 是一个多功能蛋白质。tTG 能催化 Ca^{2+} 依赖的蛋白质交联反应, 并在多种生物学过程中起到了重要作用, 如细胞生长与分化、受体介导的胞吞作用、细胞黏附、细胞形态的维持以及细胞凋亡等。已有研究表明, tTG 可能在多种神经退行性疾病的病理生理过程中起到了重要作用。现就近年来有关 tTG 与神经退行性疾病研究的一些进展做一介绍。

关键词 组织转谷氨酰胺酶(tTG); 生物学功能; 神经退行性疾病

组织转谷氨酰胺酶(tissue transglutaminase, tTG)是转谷氨酰胺酶(transglutaminase, TGase)家族中的一个独特成员。tTG 能催化蛋白质交联反应并能水解 5'-鸟苷三磷酸(GTP)和腺苷三磷酸(ATP), 它还能作为 G 蛋白参与多种信号转导。有研究表明, Ca^{2+} 依赖的 tTG 酶活性与多种生物学功能有关, 如细胞生长和分化、受体介导的胞吞作用、细胞黏附、细胞形态的维持以及细胞凋亡。近年有资料显示, tTG 在阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease, AD)、亨廷顿氏病(Huntington's disease, HD)、帕金森氏病(Parkinson's disease, PD)等神经退行性疾病的病理病因学中可能扮演了重要的角色。

1 tTG 的结构及组织分布

已知哺乳动物 TGase 有 7 种类型(表 1), tTG 即胞质 TGase, 也称组织型或 II 型 TGase。

tTG 大量存在于肝脏中, 在其他多种器官如心、脾、肺、肾中的表达水平则各不相同。在多种组织细胞内如动脉、血管、毛细血管中的内皮细胞和平滑肌细胞都有 tTG 的结构性表达^[1]。由此可见, 它是一个在各种器官及组织中广泛分布的蛋白质。

人类 tTG 基因定位于第 20 号染色体上, 长 32.5 kb, 由 13 个外显子和 12 个内含子组成^[2]。由 cDNA 序列推断其氨基酸序列得知, 它包含 685~691 个氨基酸, 分子量为 76~85 kDa。tTG 的活性位点含有一个半胱氨酸残基, 在豚鼠和人的 tTG 氨基酸序列中分别位于第 276 位^[3]和第 277 位^[4]。在多数 TGase

表 1 转谷氨酰胺酶(TGase)的类型

类型	名称	分子量(kDa)	主要分布
组织转谷氨酰胺酶	TG _c , TG ₂ , tTG	77	广泛分布
血浆转谷氨酰胺酶	Factor XIII	160	血液
角质细胞转谷氨酰胺酶	TG _k , TG ₁	106	上皮细胞
表皮转谷氨酰胺酶	TG _e , TG ₃	77	上皮细胞
前列腺转谷氨酰胺酶	TG _p , TG ₄	75	前列腺
转谷氨酰胺酶 X	TG ₅	81	上皮细胞
Erythrocyte band4.2	B _{4.2}	77	血液

中, 毗邻半胱氨酸周围的氨基酸具有高度保守性。tTG 的蛋白质高级结构是由一个 N 末端 β 折叠区域, 一个催化中心和两个 C 末端圆筒结构组成的。其 N 末端是活性必需部位^[5]。

2 tTG 的表达及活性的调节

tTG 在组织细胞中的表达受到了多种因素的影响。已知的有视黄酸(RA)、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子等^[6]。此外, 细胞内作为转谷氨酰胺酶酰基受体底物的多胺(polyamine)、亚精胺和精胺也能调节 tTG 的表达。用 RA 处理一些细胞系, 发现 tTG 的表达在 mRNA 和蛋白质水平均有显著增高。并且在体内, RA 也可诱导 tTG 的表达^[7]。例如, 维生素 A 缺乏的大鼠体内各组织中 tTG 表达水平都有显著降低, 但给予含有视黄酸的食物可使 tTG 的表达

收稿日期: 2004-01-09 接受日期: 2004-02-16

* 通讯作者。周嘉伟: Tel: 021-54921073, Fax: 021-54921073,

E-mail: jwzhou@sibs.ac.cn; 袁崇刚: Tel: 021-62232729, Fax: 021-62233754, E-mail: cgyuan@bio.ecnu.edu.cn

增加^[8]。目前对视黄酸诱导 tTG 表达的分子机制了解相对较多。研究表明,视黄酸通过与视黄酸受体(RAR)和视黄酸X受体(RXR)两个核受体家族结合形成 RAR/RXR 异源二聚体或 RXR/RXR 同源二聚体,它们能与启动子区的特定 DNA 序列结合从而激活靶基因的转录。将全长的 RAR 或 RXR cDNA 转入 RA 抗性的 HL-60 细胞中(HL-60 细胞携带有一个视黄酸受体的功能丧失性突变),发现 tTG 的表达显著上升^[9]。分析 tTG 基因 5' 上游核酸序列发现,一个功能性的 tTG 基因启动子含有针对多种因素的可能性反应元件和结合位点。并且也有研究表明,介导小鼠 tTG 视黄酸依赖的转录活性所必需的顺式作用元件位于 tTG 基因 5' 末端侧约 3.8 kb 的 DNA 序列中。此外,对人的 tTG 基因启动子进行功能分析发现其编码区(包含一个 TATA 框,4 个 SP1 位点和位于翻译起始位点上游的 134 bp 序列中的 4 个可能的 NF-1 位点)具有很高的结构性转录活性^[10,11]。

tTG 活性受到了多种因素的影响。McCormack 等发现^[12],通过 α -二氟甲基鸟氨酸(DFMO,特异性的多胺合成的限速酶,鸟氨酸脱羧酶的不可逆抑制剂)抑制多胺的内源性合成,能引起大鼠小肠隐窝细胞 TGase 酶活性显著降低。与之相反的是,抑制人结肠癌细胞(Caco-2)中多胺的合成则导致 TGase 活性的增强。DFMO 在两种细胞系中的相反作用提示胞内多胺对 tTG 的活性可能具有细胞类型特异性的调节作用。近年来,tTG 的活性调节已成为研究的焦点。早期的体外研究表明,鸟核苷酸能调节 tTG 的蛋白质交联活性。tTG 与 GTP 结合后构象发生改变,对 Ca^{2+} 亲和力降低,从而抑制了 tTG 的 Ca^{2+} 依赖的蛋白质交联活性。另一方面, Ca^{2+} 浓度的升高能降低 GTP 对 tTG 活性的抑制作用,这表明 tTG 的活性同时受到了 Ca^{2+} 和 GTP 浓度的调节^[13]。在 tTG 可以作为水解酶催化的 ATP 和 GTP 的水解反应,但这个过程必须有 Mg^{2+} 的参与。有研究证明, Mg^{2+} -GTP 和 Mg^{2+} -ATP 复合物才是 tTG 介导的水解反应的真正底物。 Mg^{2+} -GTP 与 tTG 结合引起的构象改变能抑制 tTG 的蛋白质交联活性而不影响其 ATPase 酶活性,而 Mg^{2+} -ATP 与 tTG 的结合引起的构象改变却抑制了 GTPase 酶活性但不影响其蛋白质交联活性。由此来看, Mg^{2+} -核苷复合物对 tTG 的活性调节也具有重要作用。

3 tTG 的生物学功能

tTG 一般存在于胞质中。它能催化 Ca^{2+} 依赖的交联反应,对蛋白质进行翻译后修饰,在多肽链之间或多肽链内催化生成二肽键。此反应是由谷氨酰胺残基上的 γ 氨基酰胺基团中的氨与伯胺发生交换而完成的。以肽键相连的赖氨酸或多胺作为伯胺参与反应,形成 ϵ -(γ -谷氨酰)赖氨酸或(γ -谷氨酰)-多胺键。反应中酶与 Ca^{2+} 结合后,暴露出活性部位的半胱氨酸残基,后者与谷氨酰胺底物反应,形成酰基-酶中间物并释放出氨,继而酰基-酶复合物与伯胺反应形成 γ -谷氨酰-氨基交联物,最后释放出酶^[14]。由 tTG 催化形成的蛋白质交联物在多种生物学过程中具有重要的生理作用。此外,tTG 还具有水解 GTP 和 ATP 的功能^[15]。它与 GTP 结合后还具有 GTP 结合蛋白 $\text{G}\alpha_n$ 信号转导的功能,激活磷脂酶 C δ 受体,从而激活了它的一些效应酶^[16]。tTG 可能参与了多种生理过程,如伤口的愈合、基质的稳定、细胞信号转导(作为 G 蛋白,其活性受到 GTP 的负反馈调节)、细胞分化、受体介导的细胞内吞作用、细胞黏附及凋亡等。

在大鼠出生后发育过程中,小脑皮层颗粒细胞中有大量 tTG 的表达,并与其催化交联反应的底物共定位在轴突的黏着斑部位。因此有人推测 tTG 可能与细胞之间的相互作用及基底连接有关^[17]。Tucholski 等^[18]发现用 RA 诱导人成神经瘤细胞 SH-SY5Y 细胞分化产生神经突起的同时,tTG 的表达量也显著增高。通过转入 tTG 野生型、突变型和反义序列得到 3 种稳定细胞株,分别用低血清培养基刺激其分化发现,野生型即过表达 tTG 的细胞向神经元的形态分化,而其余两种细胞(表达丧失功能的 tTG 或抑制 tTG 表达)则继续增殖,仍维持未分化的形态。由此可见,tTG 在 SH-SY5Y 细胞分化过程中起了重要作用。近来发现 tTG 能与核转运蛋白 importin- α 3 有相互作用,被激活性地转入核内,这一过程可能与某些关键的细胞生物学过程有关。此外,细胞外基质(ECM)中的一些蛋白质,如胶原蛋白 II 和 III、骨黏连蛋白、骨桥蛋白,能作为 tTG 催化的交联反应的底物,这表明 tTG 在稳定基质以抵抗化学降解和蛋白质水解中可能起某种作用。

4 tTG 与凋亡的联系

tTG 在凋亡过程中可被诱导和激活。例如,硝酸铅可诱导肝肥大退化,在凋亡的细胞中,tTG 的 mRNA,蛋白质水平显著升高,并且 tTG 催化生成

的异二肽键也显著增多^[19]。在 RA 诱导子宫颈腺癌和成神经瘤细胞的凋亡中也伴有 tTG 蛋白水平的显著升高,提示 tTG 与细胞凋亡相关。进一步的研究表明 tTG 在其中可能起的作用。有实验显示, tTG 的过表达能显著减少 TNF- α 处理后 L-929 细胞中的大分子流失^[20],而这种保护性作用能被 tTG 交联活性的专一性抑制剂所阻断。据此推测在发生凋亡的细胞中, tTG 可能催化了胞内蛋白质的相互交联,通过阻止大分子物质向胞外渗漏来维持凋亡细胞的结构,从而避免了细胞内容物流出胞外引起周围细胞的炎症反应。但与此相反的是,有研究发现将 tTG 的全长 cDNA 序列转入 3T3 成纤维细胞,以及 SK-N-BE 人成神经瘤细胞和 L-929 纤维原细胞后,细胞自发性凋亡增多或对各种致命的诱导因素的敏感性大大增强^[21]。因此, tTG 在细胞凋亡中究竟起何种作用尚不确定。

5 tTG 在神经退行性疾病中的作用

tTG 广泛分布于中枢神经系统中,生理状态下 tTG 的活性较低,在多种病理条件下活性增强,在多种疾病中都可见 tTG 的活性和定位都发生了变化。但目前 tTG 在病理过程中的作用还不清楚,其在神经退行性疾病中的作用更是当前研究的热点之一。

5.1 阿尔茨海默氏病

阿尔茨海默氏病(AD)是最为常见的与年龄相关的神经退行性疾病。部分脑区神经元的功能丧失或死亡导致患者记忆力、思考能力及行为能力下降。AD 在病理学上的两个主要特征是胞外的炎症样斑块和神经元胞内的神经纤维缠结。前者主要由含淀粉样 β -蛋白 42(amyloid β -protein 42, A β 42)的淀粉纤维组成,而后者则主要由成对的螺旋状细丝(paired helical filaments, PHF)组成^[22],而 PHF 主要成分为过磷酸化的微管相关蛋白 tau。tTG 具有催化蛋白质交联反应的活性,因此它可能参与了这些难溶性成分的形成。事实上, tTG 与 tau 蛋白共定位于 PHF 中,并且体外实验也证明 tau 是 tTG 的极好底物^[23]。Bonelli 等^[24]通过对 33 例 AD 病人脑脊液的 ELISA 检测发现其 tTG 的浓度要大大高于对照组病人。另外, AD 病人脑中 Ca^{2+} 的动态平衡由于胞内 Ca^{2+} 水平的增高而打破,而 Ca^{2+} 浓度是 tTG 活性调节的一个重要因素^[25]。这些体内和体外的研究表明, tTG 在 AD 的病理病因学中有重要作用,它可能

是 AD 病人神经退行性病变的重要生化指标,并成为 AD 检测和诊断的指示分子。

5.2 帕金森氏病

帕金森氏病(PD)是继 AD 之后的另一个较为常见的神经退行性疾病。其主要特征是:震颤、运动迟缓、僵化和姿势不稳。这些运动功能紊乱主要是因为黑质-纹状体通路上多巴胺能神经元的缺失造成的。在组织学上, PD 的另一个特征是路易小体(Lewy bodies)的广泛分布,路易小体的主要成分是 α -synuclein。该蛋白质含 140 个氨基酸,与 β -和 γ -synuclein 同源。这 3 个蛋白质的功能目前尚不完全明了。在 PD 病人的路易小体内检测到了 α -synuclein 的一个非淀粉组分的片断(non-amyloid component, NAC)。NAC 含有谷氨酰胺和赖氨酸残基,能分别作为 tTG 介导的 ϵ (γ -谷氨酰)赖氨酸形成反应中的氨甲酰及胺供体。tTG 能催化 NAC 聚合体及 NAC 与 β -淀粉肽聚合物的形成,并对原代培养的多巴胺能神经元以及成神经细胞瘤细胞产生神经毒性^[26]。另一方面, Citron 等^[27]也检测到 PD 病人脑内 tTG 的 mRNA 水平与对照组比较有显著上升。由此可见,在 PD 的病理形成过程中 tTG 可能起到了某种作用。

5.3 亨廷顿氏病

亨廷顿氏病(HD)是一种常染色体显性神经退行性疾病,其病理特征是进行性运动机能紊乱及痴呆。最普遍的临床表现为舞蹈症。与 HD 相关的突变基因以及基因产物(huntingtin)均已得到鉴定。Huntingtin 蛋白的分子量为 350 kDa,其功能尚不清楚。在 HD 病人脑中发现,神经元核内以及胞浆中都有由 huntingtin 蛋白构成的包涵体。huntingtin 基因发生病理性突变后, CAG 重复序列的异常延伸导致了蛋白质产物 huntingtin 中 39 个以上的谷氨酰胺残基形成多聚谷氨酰胺延伸(Qn),而正常情况下大约只有 10~25 个谷氨酰胺残基。含有 Qn 的大分子易于形成不溶性的聚合物^[28]。另外,通过检测发现, HD 病人的脑组织中 tTG 的表达及酶活性明显增高^[29]。tTG 能催化蛋白质交联形成不溶性的丝状聚合物,而多聚谷氨酰胺是 tTG 的极好底物,多聚谷氨酰胺的聚合程度越高越易于被 tTG 催化形成难溶的聚合物,多聚谷氨酰胺长度的增加不仅使作为 tTG 底物的谷氨酰胺残基数量增加,而且使底物与酶结合的亲和力增强。突变的 huntingtin 蛋白中多聚谷氨酰胺的病理性延伸无疑使其更易于被 tTG 催化形成难溶

性物质。以上发现表明, tTG 可能在 HD 的病理过程中有着重要作用。

6 小结

tTG 是一个广泛分布的蛋白质, 近年来它与多种生命现象以及与各种疾病, 尤其是神经退行性疾病的关系日益受到人们的关注。迄今为止, 有关 tTG 的研究表明, 它能催化蛋白质交联, 具有 GTP 酶和 ATP 酶活性, 还有可能作为经典的 G 蛋白参与信号转导。多种蛋白质都可以作为该酶的底物, 并且这些蛋白质底物在经过 tTG 的修饰改变后参与了多种疾病的病理生理学过程。在多种神经退行性疾病中, tTG 的酶活性增高, 而其活性增高与病变脑区的蛋白质聚合物的形成有着密切联系。它在这些病理过程中究竟发挥怎样的作用, 抑制 tTG 的活性或表达能否延缓疾病的发展等? 对这些问题的解答将有助于了解它在正常生理过程及疾病发生过程中的作用, 并为神经退行性疾病治疗新手段的建立提供有益的线索和途径。

参考文献 (References)

- [1] Thomazy V *et al. Cell Tissue Res*, 1989, **255**: 215
- [2] Gentile V *et al. Genomics*, 1994, **20**: 295
- [3] Ikura K *et al. Biochemistry*, 1988, **27**: 2898
- [4] Gentile V *et al. J Biol Chem*, 1991, **266**: 478
- [5] Muesch A *et al. Trends Biochem Sci*, 1990, **15**: 86
- [6] Chen JS *et al. Int J Biochem Cell Biol*, 1999, **31**: 817
- [7] Chiocca EA *et al. J Biol Chem*, 1988, **263**: 11584
- [8] Verma AK *et al. J Nutr*, 1992, **122**: 2144
- [9] Zhang LX *et al. J Biol Chem*, 1995, **270**: 6022
- [10] Szegezdi E *et al. Cell Death Differ*, 2000, **7**: 1225
- [11] Nagy L *et al. J Biol Chem*, 1996, **271**: 4355
- [12] McCormack SA *et al. Am J Physiol*, 1994, **267**: C706
- [13] Smethurst PA *et al. Biochem J*, 1996, **313**: 803
- [14] Lorand L *et al. Mol Cell Biochem*, 1984, **58**: 9
- [15] Lee KN *et al. Biochim Biophys Acta*, 1993, **1202**: 1
- [16] Nakaoka H *et al. Science*, 1994, **264**: 1593
- [17] Perry MJ *et al. Neuroscience*, 1995, **65**: 1063
- [18] Tucholski J *et al. Neuroscience*, 2001, **102**: 481
- [19] Fesus L *et al. FEBS Lett*, 1987, **224**: 104
- [20] Fesus L. *Cell Mol Neurobiol*, 1998, **18**: 683
- [21] Piacentini M *et al. Eur J Cell Biol*, 1991, **54**: 246
- [22] Kim SY *et al. Neurochem Int*, 2002, **40**: 85
- [23] Tucholski J *et al. J Neurochem*, 1999, **73**: 1871
- [24] Bonelli RM *et al. Neurobiol Dis*, 2002, **11**: 106
- [25] Brzyska M *et al. Acta Neurobiol Exp*, 2003, **63**: 171
- [26] Jensen PH *et al. Biochem J*, 1995, **310**: 91
- [27] Citron BA *et al. Neurochem Int*, 2002, **40**: 69
- [28] Lesort M *et al. J Neurochem*, 1999, **73**: 2018
- [29] Chun W *et al. Neurobiol Dis*, 2001, **8**: 391

The Role of Tissue Transglutaminase in Neurodegenerative Diseases

Xiao-Jing Yu^{1,2}, Jia-Wei Zhou^{1*}, Chong-Gang Yuan^{2*}

(¹Key Laboratory of Proteomics, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; ²School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract Tissue transglutaminase (tTG) is one of members of transglutaminase family. It is believed to be a multifunctional protein, which can catalyze cross-linking of protein and hydrolyzation of GTP and ATP. Furthermore, tTG can function as G_{α} in Ca^{2+} -associated signal pathway. It has been reported that tTG is involved in a broad range of biological processes such as cell growth and differentiation, receptor-mediated endocytosis, cell adhesion, maintenance of cell morphology and inducement of apoptosis. Recently, it has been suggested that tTG may play important roles in pathogenesis of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease. Some recent progress on the involvement of tTG in these diseases will be presented in this review.

Key words tissue transglutaminase (tTG); biological function; neurodegenerative diseases

Received: January 9, 2004 Accepted: February 16, 2004

*Corresponding author. Jia-Wei Zhou: Tel: 86-21-54921073, Fax: 86-21-54921073, E-mail: jwzhou@sibs.ac.cn

Chong-Gang Yuan: Tel: 86-21-62232729, Fax: 86-21-62233754, E-mail: cgyuan@bio.ecnu.edu.cn