

14-3-3 蛋白家族的调控机制和生物学功能

伍家发 吴 乔*

(厦门大学生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘要 14-3-3 蛋白家族在真核细胞中广泛表达并高度保守, 它们主要以同源/异源二聚体形式存在, 可以同时与两个靶蛋白或一个靶蛋白的两个结构域相互作用。14-3-3 蛋白通过磷酸化丝氨酸/苏氨酸介导和靶蛋白结合, 从而发挥其调控功能。现对 14-3-3 蛋白的识别序列、与配体相互作用的特点, 及其在细胞周期、凋亡、信号转导、线粒体/叶绿体前体蛋白跨膜转运中的调控机制和发挥的生物学功能进行综述。

关键词 14-3-3 蛋白; 蛋白质相互作用

14-3-3 蛋白为酸性蛋白质, 分子量约为 30 kDa。在哺乳动物中存在 7 种异构体(β 、 ϵ 、 γ 、 η 、 σ 、 τ 、 ζ), 不同的异构体之间可以形成同源/异源二聚体。原先命名的 α 、 δ 实际是 β 、 ζ 的磷酸化形式。1967 年 Moore 等^[1]人在研究脑蛋白质系统分类时发现 14-3-3 蛋白, 这一奇特的名称是根据其 DEAE-纤维素层析的片段数目和凝胶电泳的迁移位置来命名的。在脑组织中含有大量的 14-3-3 蛋白, 约占全部可溶性蛋白质的 1%。现已清楚 14-3-3 蛋白并非局限于脑组织, 而是存在于几乎所有的组织中。14-3-3 蛋白主要分布在细胞浆, 也存在于质膜、细胞核、高尔基体、叶绿体、线粒体^[2,3]。14-3-3 蛋白的主要功能是作为接头/支架蛋白与其他蛋白质结合, 进而通过多种机制调节它们的生物学功能。已有 100 多种蛋白质被证明可以与 14-3-3 蛋白相互作用, 包括各种蛋白激酶、受体、支架蛋白、细胞周期调控蛋白、转录因子和凋亡调控蛋白、线粒体/叶绿体前体蛋白等^[4-9]。因此 14-3-3 蛋白广泛参与了细胞凋亡、细胞分裂、信号转导、蛋白跨膜转运等重要生命活动的调节进程。

由于 14-3-3 蛋白家族结合的靶蛋白类型十分复杂, 因此 14-3-3 蛋白的生物学功能也十分复杂, 除了作为接头/支架蛋白之外, 14-3-3 蛋白还作为激活剂、抑制剂等; 此外 14-3-3 蛋白还具有和分子伴侣 HSP70 相似的功能, 即 14-3-3 蛋白可以协助线粒体/叶绿体前体蛋白的跨膜转运^[6-9]。随着研究的深入, 相信将会发现 14-3-3 蛋白更多的新功能。

靶蛋白中是否存在同一序列识别 14-3-3 蛋白? 研究表明, 在已发现的配体中主要通过磷酸化丝氨酸/苏氨酸识别序列与 14-3-3 蛋白结合, 此外还存在非磷酸化识别序列。

1.1 磷酸化丝氨酸/苏氨酸识别序列

1.1.1 经典的磷酸化丝氨酸/苏氨酸序列模体 (motif) 已发现的配体中绝大多数含有两类磷酸化丝氨酸/苏氨酸序列模体, 即: (i)R(S/Ar)(+)p(S/T)XP, (ii)RX(Ar)(+) p(S/T)XP。其中 p(S/T)代表磷酸化丝氨酸/苏氨酸, Ar 代表芳香氨基酸, + 代表基本氨基酸, 在 p(S/T)后面的 X 通常为 Leu、Glu、Ala 或 Met。将 Raf-1 的 S259、S621 突变为 Ala 后, 与 14-3-3 蛋白的亲合力明显减弱^[2], 可见丝氨酸在介导配体和 14-3-3 蛋白的结合非常重要。根据这些序列模体可以推测某些蛋白质能否和 14-3-3 蛋白结合。

1.1.2 丝氨酸富集型序列模体 (Ser-rich motif) 其序列模体为 $RX_{1-2}SX_{2-3}S$, X 代表基本氨基酸, 2 个丝氨酸中至少 1 个必须磷酸化。Cbl、PKC μ 都含有这种序列模体^[2,5]。

1.1.3 其他序列模体 可归纳为 RSXpS 和 QQYpTV-COOH, 后者序列模体只存在于植物的 H⁺-ATPase 中^[5]。

1.2 非磷酸化识别序列

Raf-1 除了含有上述 2 个丝氨酸结合位点(S259、S621)外, 还含有第 3 个非磷酸化结合位点——Cys 富集型结构域,此外在线粒体定向序列中也存在非磷酸化序列模体^[2]。

1 14-3-3 蛋白识别序列

14-3-3 蛋白能和众多蛋白质结合, 那么在这些

收稿日期: 2004-09-23 接受日期: 2004-12-06

* 通讯作者。Tel: 0592-2182542, Fax: 0592-2086630, E-mail:

xgwu@xmu.edu.cn

2 14-3-3 蛋白和配体相互作用的特点

非磷酸化配体和磷酸化配体与 14-3-3 蛋白结合的亲和力都很高,而且非磷酸化配体和 14-3-3 蛋白的相互作用能够被磷酸化丝氨酸肽段所抑制,说明两类配体和 14-3-3 蛋白的结合位点是相同的,14-3-3 蛋白和非磷酸化配体、磷酸化配体的晶体结构分析也证明了这一点^[2]。

1 个含有多个识别序列的配体可同时和 14-3-3 蛋白二聚体的 2 个亚基相互作用,14-3-3 蛋白和靶蛋白的 2 个低亲和力位点作用可明显地增加识别的特异性和亲和力,14-3-3 蛋白和配体多个位点作用使配体构象发生改变从而调控信号转导^[4,5]。

14-3-3 蛋白含有一系列分散的 α 螺旋结构,它们之间的相互作用使 14-3-3 蛋白分子结构异常僵硬。14-3-3 蛋白在结合肽段和未结合肽段之间的位移极其微小,因此 14-3-3 蛋白就像分子砧(molecular anvil)使结合的配体变形,而自身结构变化很小^[10]。

3 14-3-3 蛋白的调控机制

14-3-3 蛋白调控靶蛋白的机制可归纳为以下几个方面:(1)14-3-3 蛋白可以改变靶蛋白与其他结合蛋白相互作用的能力,如 14-3-3 蛋白和 Bad 结合,促使 Bad 和 Bcl-x1/Bcl-2 分离^[2]。(2)14-3-3 蛋白可以抑制或增强靶蛋白的催化活性,如 14-3-3 ζ 可不同程度增强 PKC α 、 β 、 γ 、 ϵ 、 ζ 的活性,而 14-3-3 τ 可抑制 PKC μ 的活性^[10,11]。(3)14-3-3 蛋白可以保护靶蛋白,使其免于蛋白酶或磷酸酶的作用。如 14-3-3 蛋白可使 Raf-1、组蛋白、Bad 免于磷酸酶的去磷酸化作用,使 *Arabidopsis* 中的磷酸蔗糖合成酶(SPS)免于蛋白酶的水解作用^[12,13]。(4)14-3-3 蛋白可以作为接头蛋白/支架蛋白(adaptor/scaffold protein)介导两个靶蛋白的相互作用,如 14-3-3 蛋白可介导 Raf 和 Bcr、Raf 和 A20、Raf 和 PKC 的相互作用^[12]。(5)改变靶蛋白的 DNA 结合活性。DNA 损伤后,14-3-3 蛋白通过与 p53 结合增强 p53 的 DNA 结合活性^[14]。(6)14-3-3 蛋白可以调控靶蛋白的核浆转运和亚细胞定位。如 14-3-3 蛋白可以促进 cyclinB1/cdc2、MSN2、MSN4、NFAT、FKHRL1 由细胞核向胞浆转运,促进 Tlx-2、TERT 由胞浆向细胞核转运^[15],介导钾离子通道蛋白由内质网向细胞质膜转运^[16]。

以上几种调控机制并非相互独立存在,有时几种机制可以同时发生在同一种靶蛋白上,如 14-3-3 蛋白结合 Bad 可以促使其与 Bcl-2/Bcl-x1 分离并从线粒体转运到细胞浆,同时可以保护其免于钙调磷酸酶(calcineurin)的水解作用^[2]。

4 14-3-3 蛋白的生物学功能

14-3-3 蛋白能够以多种调控机制与大量靶蛋白相互作用,在细胞生命活动中发挥重要的调控功能。

4.1 14-3-3 蛋白与细胞周期

Cdc25 是细胞周期的主要调控因子之一。在 DNA 损伤信号诱导下,Chk1 等激酶可使 cdc25 的 S216 发生磷酸化,由此产生 14-3-3 蛋白的识别序列;同时,在 cdc25 的 S216 附近含有核输出序列(NES)和核输入序列(NLS),因此 14-3-3 蛋白通过与 cdc25 结合调控 cdc25 的核浆穿梭转运(nucleocytoplasmic shuttling)。如果将 14-3-3 蛋白在 *S.pombe* 中的同系物 Rad24 的 NES 突变后, DNA 损伤信号就不能诱导 cdc25 核输出^[2,17],因此 14-3-3 蛋白能够作为核输出信号调控 cdc25 的核输出。但是有研究发现 14-3-3 蛋白主要通过阻止 cdc25 与核输入因子 importin α 的相互作用而抑制 cdc25 入核^[18,19]。事实上,这两种结论并不相互矛盾,因为 14-3-3 蛋白可能与 cdc25 的 NLS 和 NES 协同作用来调控 cdc25 的动态核浆穿梭转运及其亚细胞定位,从而影响细胞周期进程。

14-3-3 蛋白还可以直接或间接地使 cdc2 处于失活状态,阻止 G₂/M 转换。另外,14-3-3 蛋白可激活 p53 转录,p53 再抑制 G₁/S 转换;但是 p53 激活后反过来又可以诱导 14-3-3 σ 表达,由此抑制 G₁/S 和 G₂/M 转换^[20]。可见 14-3-3 蛋白在调控细胞周期进程中发挥着重要作用。

4.2 14-3-3 蛋白与细胞凋亡

Bad 通过结合 Bcl-x1/Bcl-2 从而抑制 Bcl-x1/Bcl-2 的抗凋亡效应。Bad 分子上含有 2 个 14-3-3 蛋白识别序列:RHSps¹¹²YP 和 RSRps¹³⁶AP。在生存信号诱导下,蛋白激酶 PKB/Akt 磷酸化 Bad 的 S136,从而暴露与 14-3-3 蛋白的结合位点,通过两者蛋白质的结合阻断 Bad 与 Bcl-x1/Bcl-2 的相互作用并使 Bad 从线粒体转运到胞浆,从而抑制 Bad 诱导的细胞凋亡。反之,由于 Ca²⁺ 内流缘故,钙调磷酸酶使 Bad 的 S112、S136 去磷酸化,导致 Bad 与 14-3-3 蛋白分离并重新转运到线粒体上与 Bcl-x1/Bcl-2 结合,从而引起细胞凋亡^[2]。此外,14-3-3 蛋白还可以抑制 Bax、ASK1、FKHRL1 等的促凋亡效应^[20]。

4.3 14-3-3 蛋白与信号转导

Raf-1 是丝氨酸/苏氨酸激酶,在生长因子诱导的信号转导中发挥关键的作用。活化的 GTP 结合蛋白 Ras 直接和 Raf-1 作用并将其募集到细胞质膜上,Raf-1 在细胞质膜上被激活,在这一激活过程中 14-3-3 蛋白具有双重作用:在没有激活信号时维持 Raf-1 失活状态;在激活信号存在下激活 Raf-1 并稳定其活化构象^[2]。

Raf-1 可分为两个功能结构域: N 端抑制结构域和 C 端催化结构域; N 端包含 RBD(Ras binding domain)、CRD(cysteine-rich domain)和 pS259(可结合 14-3-3 蛋白), C 端含有 14-3-3 蛋白结合位点 pS621^[21]。CRD 除了结合 14-3-3 蛋白之外, 还可以结合 Ras、磷脂酰丝氨酸。14-3-3 蛋白和 Raf-1 N 端的 CRD、pS259 结合, 维持其失活状态。在有丝分裂原信号作用下, GTP-Ras 和 RBD 结合, 将 Raf-1 募集到细胞质膜上, 这时磷脂酰丝氨酸(PS)可以和 CRD 作用, 并将 14-3-3 蛋白从 CRD 和 pS259 上置换出去, 部分激活 Raf-1, 然后 Raf-1 再被其他机制进一步激活^[2]。14-3-3 蛋白和 pS621 的相互作用对 Raf-1 的激活是必需的, 将 14-3-3 蛋白从 Raf-1 复合体中去除导致 Raf-1 失活^[22]。因此 14-3-3 蛋白可能是激活 Raf-1 必不可少的协同因子。此外, 14-3-3 蛋白还可以作为接头蛋白介导 Raf-1 和 Bcr、KSR、A20、PKC、REK 结合^[20]。

14-3-3 蛋白还可以与 PDK1、MEKK1、MEKK2、MEKK3、PI3-K、肾上腺素 α_2 受体、糖皮质激素受体 α 、甲状旁腺激素受体、IL-3 受体、IL-5 受体、钙调蛋白、PLC 等作用, 在不同层次上调控大量的信号转导途径, 引起相关基因转录激活或抑制^[20,23]。

4.4 14-3-3 蛋白与线粒体、叶绿体前体蛋白跨膜转运

研究人员发现一种可以促进前体蛋白进入线粒体的蛋白质因子 MSF (mitochondrial import stimulating factor, MSF), 后来证实 MSF 是由 14-3-3 ϵ 和 14-3-3 ζ 组成的二聚体^[6,7]。它们可以协助前体蛋白靶向线粒体表面的受体复合物 Tom70-Tom37, 进而形成 MSF-前体蛋白-Tom70-Tom37 四聚体。ATP 水解后, MSF 被释放出来, 前体蛋白接着被转运到另一个受体复合物 Tom20-Tom22。由分子伴侣 HSP70 协助的前体蛋白靶向线粒体不需要受体复合物 Tom70-Tom37 的协助, 而是直接转运到 Tom20-Tom22^[8]。因此 14-3-3 蛋白在此处的作用被认为类似于分子伴侣 HSP70 的作用。

14-3-3 蛋白可以和叶绿体前体蛋白 PSI-N (photosystem I N-subunit) 的转运肽相互作用, 并出现在叶绿体基质和基质面类囊体膜中^[7]。May 等^[9]发现 14-3-3 蛋白可以和叶绿体前体蛋白、HSP70 形成三聚体, 此三聚体跨膜转运速率是单个前体蛋白的 3~4 倍。尽管 14-3-3 蛋白在叶绿体前体蛋白跨膜转运中也是发挥分子伴侣 HSP70 的作用, 但是否存在 14-3-3 蛋白依赖性和非依赖性的两种途径有待进一步研究。

5 14-3-3 蛋白与疾病

α -Synuclein 和 14-3-3 蛋白具有物理和功能上的同源性, α -Synuclein 可以结合 14-3-3 蛋白及其配体。在许多神经退化性疾病患者的轴突和 Lewy bodies 中发生 α -Synuclein 累积, 可以作为帕金森症 (Parkinson's disease, PD) 和 diffuse Lewy bodies 症的病理学标记^[24,25]。Xu 等^[25]发现可溶性的 α -Synuclein 复合物在 PD 患者的黑质中含量显著增加, 其中含有 14-3-3 蛋白。在阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 中, 14-3-3 蛋白定位于神经纤维缠结 (neurofibrillary tangle, NFT) 中, NFT 含有微管结合蛋白 tau, 14-3-3 ζ 可以促进 tau 磷酸化, 导致微管不稳定和 NFT 的形成, 最后引起神经退化^[26]。位于克雅氏病 (Creutzfeldt-Jacob disease, CJD) 患者脑脊液特定的 14-3-3 蛋白异构体可作为其诊断标志物^[27-29]。此外, 在神经元遭到破坏的 AIDS 患者的脑脊液中也发现 14-3-3 ϵ 、 γ 、 ζ 浓度升高, 当这些蛋白质从受到破坏的神经细胞中释放出来时, 可以作为已受到破坏神经元数量的实时标记物^[30]。

14-3-3 σ 和癌症发生密切相关。在多种肿瘤细胞中发现 14-3-3 σ 基因的“CpG 岛”发生高频率的甲基化, 使 14-3-3 σ 基因沉默或低表达, 从而引起 G₂ 期检控点损伤, 导致基因缺陷积累, 细胞发生恶性转化^[14,31]。在乳腺癌 MCF-7 细胞中, EFP (泛素连接酶 E3) 作用于 14-3-3 σ 并引起其降解, 从而促进乳腺癌细胞生长^[32]。14-3-3 σ 除了可以激活 p53 转录之外, 还可以阻断 Mdm2 介导的 p53 泛素化和核输出, 使 p53 表达稳定, 进而发挥其抑制肿瘤细胞生长的作用^[33]。在某些肺癌细胞中也发生 14-3-3 ϵ 基因缺失, 导致 G₂ 期检控点损伤^[34]。此外, 14-3-3 β 、14-3-3 τ 似乎具有致癌特征, 因为在肿瘤细胞中它们的表达水平上调^[14]。

6 展望

通过蛋白质相互作用, 14-3-3 蛋白在生命活动中发挥了重要调控功能。磷酸化在介导 14-3-3 蛋白和靶蛋白相互作用中发挥了关键作用: 一方面磷酸化产生 14-3-3 蛋白识别序列, 另一方面磷酸化还可以直接调控 14-3-3 蛋白和靶蛋白的结合, 如 S58 的磷酸化可以导致 14-3-3 蛋白二聚体结构破坏^[35], S184 和 T232 的磷酸化可以调控 14-3-3 蛋白与靶蛋白的结合能力^[2,36]。因此确定位于上游的激酶和磷酸酶, 可以更好地了解 14-3-3 蛋白的动态调控。

如上所述, 14-3-3 蛋白通常具有抑制细胞周期和阻止细胞凋亡的作用。因此, 干扰 14-3-3 功能可能引起细胞快速增殖并增强细胞对凋亡的敏感

性, 由此提高传统抗癌药物的疗效, 因为这些药物对那些快速增殖的细胞具有选择性, 对凋亡敏感的细胞更有疗效。通过结构研究, 可以设计特异性针对“14-3-3蛋白-配体”相互作用的抑制剂或稳定剂, 进而确定这些抑制剂或稳定剂是否具有治疗某些疾病的作用。

在植物和动物发育过程中, 14-3-3蛋白的表达具有时间和空间特异性, 表明在发育过程中不同的异构体具有独特的作用^[3], 近年来发展的RNA干扰技术为人们研究7种14-3-3蛋白异构体的特异功能提供了良好手段。

14-3-3蛋白不仅在众多信号通路的串话(cross talk)中、甚至在整个复杂的信号网络系统中可能发挥整合的作用。综合运用新的蛋白质组技术和已有的基因组数据, 人们将会发现更多的能够和14-3-3蛋白相互作用的蛋白质, 届时14-3-3蛋白介导的信号调控网络必将进一步扩大。

参考文献 (References)

- [1] Moore BW *et al.* In: Carlson FD (ed.) *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*, New Jersey: Prentice Hall, 1967, 343
- [2] Fu H *et al.* *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2000, **40**: 617
- [3] Aducci P *et al.* *IUBMB Life*, 2002, **53**: 49
- [4] Yaffe MB *et al.* *FEBS Lett*, 2002, **513**: 53
- [5] Aitken A. *et al.* *Biochem Soc Trans*, 2002, **30**: 351
- [6] Alam R *et al.* *J Biochem(Tokyo)*, 1994, **116**: 416
- [7] Sehnke PC *et al.* *Plant Physiol*, 2000, **122**: 235
- [8] Jackson-Constan D *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1541**:102
- [9] May T *et al.* *Plant Cell*, 2000, **12**: 53
- [10] Acs P *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **216**: 103
- [11] Hausser A *et al.* *J Biol Chem*, 1999, **274**: 9258
- [12] Tzivion G *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 3061
- [13] Cotellet V *et al.* *EMBO J*, 2000, **19**: 2869
- [14] Hermeking H. *Nat Rev Cancer*, 2003, **3**: 931
- [15] Muslin A J *et al.* *Cell Signal*, 2000, **12**: 703
- [16] Nufer O *et al.* *Curr Biol*, 2003, **13**: R391
- [17] Lopez-Girona A *et al.* *Nature*, 1999, **397**: 172
- [18] Yang J *et al.* *EMBO J*, 1999, **18**: 2174
- [19] Kumagai A *et al.* *Genes Dev*, 1999, **13**: 1067
- [20] van Hemert MJ *et al.* *Bioessays*, 2001, **23**: 936
- [21] Campbell SL *et al.* *Oncogene*, 1998, **17**: 1395
- [22] Tzivion G *et al.* *Nature*, 1998, **394**: 88
- [23] Tazawa H *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1620**: 32
- [24] Ostrerova N *et al.* *J Neurosci*, 1999, **19**: 5782
- [25] Xu J *et al.* *Nat Med*, 2002, **8**: 600
- [26] Berg D *et al.* *Nat Rev Neurosci*, 2003, **4**: 752
- [27] Green, AJ. *Biochem Soc Trans*, 2002, **30**: 382
- [28] Sanchez-Valle R *et al.* *Neurosci Lett*, 2002, **320**: 69
- [29] Baxter HC. *et al.* *Biochem Soc Trans*, 2002, **30**: 387
- [30] Wakabayashi H *et al.* *Clin Chim Acta*, 2001, **312**: 97
- [31] Ferguson AT *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 6049
- [32] Urano T *et al.* *Nature*, 2002, **417**: 871
- [33] Yang HY *et al.* *Mol Cell Biol*, 2003, **23**: 7096
- [34] Konishi H *et al.* *Cancer Res*, 2002, **62**: 271
- [35] Woodcock JM *et al.* *J Biol Chem*, 2003, **278**: 36323
- [36] Obsilova V *et al.* *J Biol Chem*, 2004, **279**: 4531

Regulatory Mechanism and Biological Function of 14-3-3 Protein Family

Jia-Fa Wu, Qiao Wu*

(The Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract The 14-3-3 proteins are a family of highly conserved regulatory molecules expressed in all eukaryotic cells, which act mainly as either homodimers or heterodimers. The 14-3-3 proteins interact with two targeting proteins or two different domains in one targeting protein simultaneously. The regulatory function of 14-3-3 proteins is mainly mediated by phosphoserine/phosphothreonine motifs. In the present review, the 14-3-3 proteins recognition sequences, the interaction of 14-3-3 proteins with its ligand and the regulatory functions of 14-3-3 proteins in cell cycle, apoptosis, signal transduction and mitochondria/chloroplast precursor proteins import are summarized.

Key words 14-3-3 proteins; protein-protein interaction

Received: September 23, 2004 Accepted: December 6, 2004

*Corresponding author. Tel: 86-592-2182542, Fax: 86-592-2086630, E-mail: xgwu@xmu.edu.cn