

促分裂原活化蛋白激酶磷酸酶

许宝青 李继喜 龚兴国*

(浙江大学生命科学院, 杭州 310027)

摘要 促分裂原活化蛋白激酶磷酸酶(mitogen-activated protein kinase phosphatases, MKPs)是一类丝/苏氨酸和酪氨酸双特异性的磷酸酶。它在细胞分化、增殖和基因表达过程中起着重要的作用。MKPs可以选择性地结合促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK),对MAPK进行去磷酸化,从而调节MAPK信号通路的活性。另一方面,MAPK也可以激活MKPs,它们的相互作用确保了细胞内信号的精确传递,并参与细胞功能的调节。

关键词 促分裂原活化蛋白激酶磷酸酶; 促分裂原活化蛋白激酶; 表达调控; 底物特异

磷酸化和去磷酸化作用是调节蛋白质生物活性的重要方式,蛋白质的磷酸化水平是通过激酶和磷酸酶相互作用来调节的。根据去磷酸化位点的特异性,磷酸酶可以分为丝/苏氨酸特异性的磷酸酶和酪氨酸特异性的磷酸酶两大类。促分裂原活化蛋白激酶磷酸酶(mitogen-activated protein kinase phosphatases, MKPs)属于丝/苏氨酸和酪氨酸双特异性磷酸酶,它可以专一性调节促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的活性。MAPK介导的信号转导通路在细胞生长、增殖、分化及凋亡中起着重要的作用^[1]。MKPs通过对MAPK上的Thr-X-Tyr序列(X为任一氨基酸)去磷酸化失活MAPK,从而调节细胞的生理活动^[2]。

1 MKPs的基本情况

1.1 MKPs 基因结构

MKPs包括酪氨酸及丝/苏氨酸双特异性MKPs和酪氨酸专一性MKPs两大类。MKPs的N端为非催化区,包含两个与cdc25磷酸酶催化区同源的短序列区^[3]。C端催化区包含有与痘苗病毒H1(vaccinia H1, VH1)同源的保守序列[I/V]HCXAGXXR[S/T]GX[F/Y](X代表任一氨基酸),该保守序列中Cys的突变往往引起MKPs底物专一性下降和去磷酸化能力的丧失。如Cys变成Ser的MKP-5突变体不能对其底物p38及c-Jun氨基末端激酶/应激活化蛋白激酶(c-jun amino-terminal kinases/stress-activated protein kinases, JNK/SAPKs)起作用^[4]。

MKPs各个成员的基因结构是与其功能相适应的。MKP-1基因的启动子序列包含AP-1和CRE位

点^[5],以及保守的E盒子和AP-2结构模体(motif)。前两个位点对蛋白激酶C及Ca²⁺/cAMP信号通路起反应,提高胞内cAMP或Ca²⁺浓度则可提高MKP-1 mRNA的表达;后两个位点可能对胞外信号调节MAPK通路的活化起反应。MKP-7是MKPs家族中的穿梭蛋白,其基因结构包括两个核定位信号(nuclear localization signal, NLS)区(氨基酸296~313和610~627)和一个亮氨酸富含的核输出信号(nuclear export signal, NES)区(氨基酸376~385),这两个区对于MKP-7的功能发挥起着重要的作用^[6]。

1.2 成员

MKPs家族成员在一级序列以及在磷酸酶活性结构域上具有一定的相似性,但它们的底物特异性、组织分布、亚细胞分布及靶基因调节方面各不相同,这表明它们有不同的功能。自1991第一个磷酸酶VH1发现至今,MKPs已经有10多个家族成员,详见表1^[7]。它们可以分为两类,一类是可诱导的位于核内的磷酸酶,如MKP-1;一类是定位于胞质且不被即刻早期基因编码的酶,如MKP-3。

1.3 存在方式

MKPs家族广泛分布于不同的组织和细胞,与其功能的发挥相适应。原位杂交研究表明MKPs在大脑中有不同的表达模式:MKP-1 mRNA主要在皮质和丘脑中表达,MKP-2 mRNA在齿状脑回、梨状皮质中表达,MKP-3 mRNA在海马中表达,而hVH-5则在大脑的许多区域中有表达^[10]。这表明MKPs在大脑中对MAPK信号通路的调节具有重要

收稿日期: 2005-01-24 接受日期: 2005-02-24

* 通讯作者。Tel: 0571-87953002, E-mail: gongxg@cls.zju.edu.cn

表 1 MKPs 家族成员情况^[7]

基因	人染色体定位	底物专一性	胞内定位
MKP-1/hVH1/3CH134/CL100	5q35	ERK=JNK/SAPK=p38	细胞核
MKP-2/hVH2/TYP-1	8p11-p12	ERK=JNK/SAPK>p38	细胞核
PAC-1	2q11	ERK=p38>JNK/SAPK	细胞核
MKP-3/rVH6/Pyst1	12q22-q23	ERK>>JNK/SAPK=p38	细胞质
MKP-4/Pyst3	Xq28	ERK>JNK/SAPK=p38	细胞质、细胞核
hVH5/M3-6	11p15	JNK/SAPK=p38>>ERK	细胞质、细胞核
MKP-5	1q41	p38 ≈ JNK/SAPK>>ERK	细胞质、细胞核 ^[4]
MKPX/Pyst2	3p21	ERK>p38	细胞质 ^[8]
hVH3/B23		ERK	细胞核
MKP-6		ERK、JNK	细胞质、细胞核 ^[9]
MKP-7	12p12	JNK>>p38>ERK	细胞质 ^[6]
VHR	17q21	ERK	细胞核
VHX		ERK	

的、专一性的作用。

2 MKPs 的表达调控及底物专一性

2.1 调节因子

MKPs 在静息状态的细胞中是不表达的,而各种刺激因素,如生长因子、压力、佛波酯等都可诱导 MKPs mRNA 的表达。并且 MKPs 家族成员受各种刺激的影响有所不同。如 MKP-1 (CL100) mRNA 可被血清饥饿的人表皮成纤维细胞生长因子所诱导。MKP-1 的鼠同源体 3CH134 的 mRNA 可在鼠 3T3 细胞中被过氧化氢及热休克所诱导。在 Leydig 双丸状细胞中,热休克可以引起 MAPKs 和 MKP-1 的蛋白质和 mRNA 水平的提高^[11]。在人成纤维细胞中, MKP-5 可被生长因子诱导,但压力却对它没有影响^[4]。糖皮质激素可以诱导 MKP-1 的表达,从而抑止 MAPK 的活性,对乳腺癌细胞的存活也有作用^[12]。另外,大脑缺氧也可以引起 MKP-1 和 MKP-3 表达水平的降低^[13]。

2.2 底物及底物特异性

MKPs 通过对 MAPK 上的 Thr-X-Tyr 序列去磷酸化而发挥生物学作用。MKPs 的底物包括胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK)、JNK/SAPKs 和 p38 三大类。

不同的 MKPs 能选择性作用于不同的 MAPK,并且 MKPs 在体内和体外表现出显著差异的底物选择性。例如重组 Pyst1 (MKP-3) 可选择性作用于 ERK 家族,它对 ERK2 的活性是对 p38 的 100 倍^[4]。ERK 可以结合 Pyst1,而 SAPKs 既不能结合也不能提高 Pyst1 的催化活性。M3-6/hVH-5 在体内的底物选择性与 Pyst1 相反,它能对 SAPKs 迅速去磷酸

化,使之失活,但对 ERK2 却没有活性^[15]。另外, MKPs 虽然是双重底物特异性磷酸酶,但对磷酸残基具有偏好性,它水解磷酸酪氨酸比磷酸苏氨酸快 40 倍,比磷酸丝氨酸快 500 倍。

2.3 MAPK 对 MKPs 的作用

研究表明 MAPK 可以通过底物专一性方式激活 MKPs 的磷酸酶活性。MKP-3 直接与 ERK2 结合并被其激活。功能突变体 D319N ERK2、JNK/SAPK 和 p38 MAPK 都不能结合 MKP-3 或引起 MKP-3 的催化活性^[16]。纯化在大肠杆菌中大量表达的 MKP-3 突变体,发现 NH₂ 末端非催化区(氨基酸 1~221)紧密结合到靶蛋白 MAPK p44 ERK1 和 p42 ERK2 上,如果该区缺失的话,则在体内不具有底物选择性^[17]。最近的研究表明, ERK1/2 可对 MKP-3 中的两个重要氨基酸残基 Ser 159 和 197 磷酸化,这两个氨基酸突变体 MKP-3 半周期提高了 3 倍,但是它们的磷酸化并不影响 MKP-3 的催化活性^[18]。MKP-4 可结合 ERK2、JNK/SAPKs 和 p38 MAPK,并且可以被它们激活。MKP-5 可以结合 p38 MAPK 并且可以有效地去磷酸化,但是重组 p38 MAPK 不能在体外激活 MKP-5^[3]。这表明 MAPK 对 MKPs 的作用与其所处的细胞活性状况有关。

2.4 底物选择性的分子机制

对 MKPs 催化结构域的研究发现, MKPs 的底物选择性可能是通过和一定的 MAPK 发生蛋白质-蛋白质相互作用来实现的。MKPs 具有 HCX₅R[S/T]G 保守序列,这一序列构成结合磷酸的 P-loop 结构。保守序列中 Arg 的胍基基团对磷酸上的氧原子起定向协调作用。晶体结构显示 Pyst1 催化区中包含一个典型蛋白质酪氨酸磷酸酶折叠环和浅的激活位点^[19]。

在缺乏底物时, 该催化区域关键催化残基的构象发生了变化。Pyst1 中一个高度保守的残基 Arg299 并没有占据催化的位置, 而另一个高度保守的残基 Asp262 为酪氨酸分离基团提供质子, 在催化过程中起着重要的作用。当加入 ERK2 时, D262N 突变使得 Pyst1 的催化活性降低, 表明该残基仅是 Pyst1 活化形式所必需的。这可能是当 ERK2 结合磷酸酶时, 天冬氨酸残基处于催化的最优构象。

3 MKPs 对 MAPK 的调控机制

MKPs 对 MAPK 的去磷酸化依赖于它在细胞上的定位, 而 MAPK 可激活 MKPs, 对 MKPs 具有一定的反馈作用。

生长因子诱导 ERK 活化, 使 ERK 转定位于细胞核, 在那里 ERK 可以磷酸化转录因子 Elk-1 等, 诱导大量基因如 MKP-1 在核中表达^[20], 之后 MKP-1 失活 ERK, 在 ERK 信号通路中形成一个负反馈, 见图 1。而 ERK 也可以促进胞质中的 MKP-3 的降解, 起着正反馈作用^[18]。这个反馈模型得到了血清刺激的鼠 3T3 成纤维细胞结果的支持。这些细胞中 ERK 的失活动力学与 MKP-1 蛋白的合成及 ERK 活性受抑制后蛋白质合成受抑制一致^[21]。在血管平滑肌细胞中, 抑制 MKPs mRNA 表达的放射霉素 D 和特异性反义寡聚核苷酸均能诱导被抑制的 ERK 活性。在 PC-12 细胞中, EGF 诱导 MKP-1 mRNA 表达, 但 ERK 的失活发生在 MKP-1 被诱导之前, 这表明在 EGF 刺激的 PC12 细胞中 ERK 的失活是独

立于 MKP-1 诱导的。因此, MKP-1 的诱导作用并不总是参与 ERK 的失活, 而 ERK 的失活可能随细胞类型及刺激类型的不同而不同。

4 MKPs 的生理学作用

4.1 参与肿瘤生成的调节

MKPs 负调控 MAPK 介导的信号转导通路, 参与细胞增殖与凋亡的调节。如 MKP-2 和 MKP-3 基因定位于一个编码前列腺癌和胰腺癌肿瘤抑制因子的区域; MKPX 和 MKP-5 分别定位于 3p21 和 1q41, 这两个区的删除通常会引起很多肿瘤的发生^[22]。H-ras MCF10A 细胞中, 水螅毒素(palytoxin)刺激 ERK 的活性, 诱导 MKP-3 活性的丧失, 表明 MKP-3 可能是表达原癌基因 Ras 的一个易受靶^[23]。通过 MKP-7 定位于 12p12, 删除该区则会引起急性成淋巴细胞白血病、急性和慢性骨髓白血病以及骨髓纤维变性综合征。这表明白血病的肿瘤抑制因子基因位于该区^[6]。MKP-1 的过表达可以削弱 TNF- α 的产生, 而对 MKP-1 的剔除实验可提高 TNF- α 和 IL-1 β 的产生^[24]。在非小细胞肺癌中, CL100/MKP-1 可作为一个阳性预兆因子, 并且它在肺癌恶性组织中表达水平比良性组织要高 5 倍, 这对于肺癌的治疗可能起着重要的作用^[25,26]。

4.2 在细胞增殖中的作用

MKP-1 的过表达阻断成纤维细胞 G₁ 期特异基因的表达和进入 S 期, 抑制正常及癌基因引起的增殖, 阻断爪蟾胚胎中 MAPK 依赖性中胚层的形成^[27]。在血管平滑肌细胞中, 反义寡聚核苷酸阻断血管紧张素 II 依赖性 MKP-1 时也导致了 MAPK 活化状态的延长。用蛋白质合成抑制因子放线酮进行预处理, 阻断 3CH134 蛋白的表达, 结果发现可以诱导 NIH3T3 成纤维中 ERK 被抑制的活性。脂多糖可引起巨噬细胞中感染细胞因子的产生, 而 MKP-1 在这个过程中起着重要的作用。用肽聚糖对鼠 RAW264.7 和初级腹膜巨噬细胞刺激后发现, MKP-1 的诱导与 MAPK 的去磷酸化同时发生^[24]。

4.3 在胚胎背部发育中的作用

胚胎背部闭合中后期表皮细胞经过形态学变化后, 迁移到覆盖胚胎的背部区。Martin-Blanco 等^[28]确定了编码一个类 CL100 双特异性磷酸酶的 puckered 基因, 它的突变可以影响该过程, 从而导致果蝇背部闭合发育异常。最新的研究也表明, MKP-3 在果蝇发育过程中起着重要的作用, 是其 Ras/ERK 信

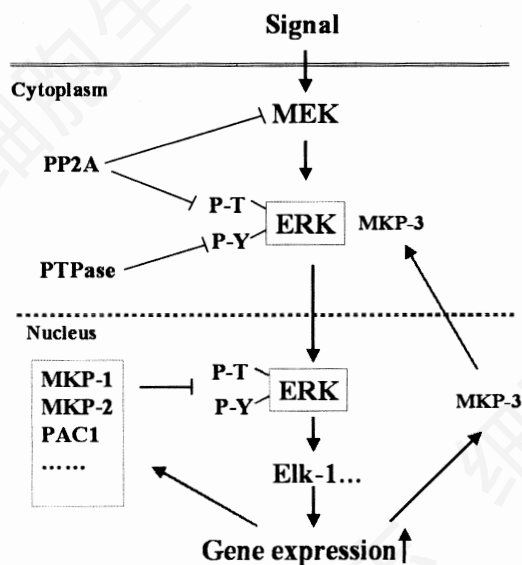


图 1 ERK 的失活模型(根据文献[7]改绘)

号通路所不可缺少的^[2]。

5 小结

MKPs 在细胞增殖、分化及凋亡起着重要的作用,但现在仍有许多问题尚未得到解决,如不同刺激引起MKPs转录活性的精确机制,MKPs对MAPK家族成员专一性选择的分子机制,它在发育、细胞及病理状态下的各种功能等。MKPs的生成和调节受到许多因素的影响,在不同的细胞中MKPs的作用机制可能不完全相同,其生理意义仍有待确认。MKPs除了作用于MAPK信号途径外,是否还可调节其他的信号通路有待于进一步的深入研究。

参考文献 (References)

- [1] Shapiro PS *et al. J Biol Chem*, 1998, **273**: 1788
- [2] Kim M *et al. Mol Cell Biol*, 2004, **24**: 573
- [3] Keyse SM *et al. Biochim Biophys Acta*, 1995, **1265**: 152
- [4] Tanoue T *et al. J Biol Chem*, 1999, **274**: 19949
- [5] Kwak SP *et al. J Biol Chem*, 1994, **269**: 3596
- [6] Masuda K *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 39002
- [7] Haneda M *et al. Eur J Pharmacol*, 1999, **365**: 1
- [8] Dowd S *et al. J Cell Sci*, 1998, **111**: 3389
- [9] Marti F *et al. J Immunol*, 2001, **166**: 197
- [10] Martell KJ *et al. J Neurochem*, 1995, **65**: 1823
- [11] Gorostizaga A *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **327**: 23
- [12] Wu W *et al. J Biol Chem*, 2005, **280**: 4117
- [13] Mishra OP *et al. Neuroscience*, 2004, **123**: 179
- [14] Groom LA *et al. EMBO J*, 1996, **15**: 3621
- [15] Muda M *et al. J Biol Chem*, 1996, **271**: 27205
- [16] Camps M *et al. Science*, 1998, **280**: 1262
- [17] Muda M *et al. J Biol Chem*, 1998, **273**: 9323
- [18] Marchetti S *et al. Mol Cell Biol*, 2005, **25**: 854
- [19] Stewart AE *et al. Nat Struct Biol*, 1999, **6**: 174
- [20] Sugimoto T *et al. J Biol Chem*, 1997, **272**: 29415
- [21] Sun H *et al. Cell*, 1993, **75**: 487
- [22] Masuda K *et al. Cytogenet Cell Genet*, 2000, **90**: 71
- [23] Warmka JK *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 33085
- [24] Shepherd EG *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 54023
- [25] Vicent S *et al. Clin Cancer Res*, 2004, **10**: 3639
- [26] Wang HY *et al. Cancer Lett*, 2003, **191**: 229
- [27] Gotoh Y *et al. EMBO J*, 1995, **14**: 2491
- [28] Martin-Blanco E *et al. Genes Dev*, 1998, **12**: 557

Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase

Bao-Qing Xu, Ji-Xi Li, Xing-Guo Gong*

(College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract Mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs), including both dual-specificity (threonine/tyrosine) and tyrosine-specific enzymes, play a key role in the process of cell proliferation, differentiation, and gene expression. MKPs can selectively bind to mitogen activated protein kinases (MAPKs), and therefore regulate the activity of MAPK-mediated signal pathway by dephosphating MAPKs. On the other hand, MAPKs can also activate MKPs. The interactions between MKPs and MAPKs insure the exactly signal transduction in cells.

Key words mitogen-activated protein kinase phosphatases; mitogen-activated protein kinase; expression regulation; substrate specificity

Received: January 24, 2005 Accepted: February 24, 2005

*Corresponding author. Tel: 86-571-87953002, E-mail: gongxg@cls.zju.edu.cn