

核糖体失活蛋白在细胞内的转运途径

王峰 詹金彪*

(浙江大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 杭州 310031)

摘要 核糖体失活蛋白(ribosome-inactivating proteins, RIPs)是一类抑制蛋白质生物合成的毒蛋白, 现已成为研究细胞生物学的重要工具并在临床抗肿瘤和抗病毒治疗上得到了广泛应用。现结合国内外近几年的研究进展就核糖体失活蛋白在细胞内的转运途径作一综述。

关键词 核糖体失活蛋白; 胞内运输; 逆向转运; 转位

核糖体失活蛋白(ribosome-inactivating proteins, RIPs)是一类能够抑制细胞核糖体合成蛋白质, 从而导致宿主死亡的毒蛋白, 广泛存在于植物、细菌中。来自植物的RIPs根据其结构的差异通常分为两类: I型和II型^[1]。其中I型是单链蛋白, 分子量约为30 kDa, 有美洲商陆毒蛋白、天花粉蛋白等; II型是异构二聚体, 分子量约为62 kDa, 含两个亚基, 即A链和B链, 通过一个二硫键相连, 该类蛋白质一般以非活性的形式被合成, 通过蛋白质水解获得毒性^[2], 如蓖麻毒素, 志贺菌毒素、霍乱毒素则是细菌RIPs的代表(图1)^[3], 它们对人体有一定的毒性。这些蛋白质毒素现已成为研究细胞生物学的有力工具: 蓖麻毒素通过末端的半乳糖与糖蛋白、糖脂结合, 此特点已被用于膜标记和内吞途径的探针^[4]; 志贺菌毒素则被用来测量高尔基体的pH值^[5]。本文主要对核糖体失活蛋白在细胞内的转运途径作一综述。

1 逆向转运途径

近几年有关RIPs在细胞内的转运途径研究很多, 目前较为清楚的是逆向转运途径, 其中以蓖麻毒素、志贺菌毒素、霍乱毒素为代表, 大体过程为(图2)^[2]: 内吞→内吞小体→高尔基体→内质网→胞液。

1.1 结合到细胞表面并内吞

RIPs大多通过受体介导的内吞入胞。细胞表面的内吞方式一般包括: 网格蛋白依赖性内吞、网格蛋白非依赖性内吞、细胞膜膜容及胞饮^[6]。志贺菌毒素、霍乱毒素大部分是通过网格蛋白依赖性内吞入胞, 它们分别与细胞表面的糖脂Gb3和GM1结合^[7]。实验证明在缺乏胆固醇的条件下, 细胞膜膜容和网格蛋白依赖性内吞均被抑制, 然而蓖麻毒素

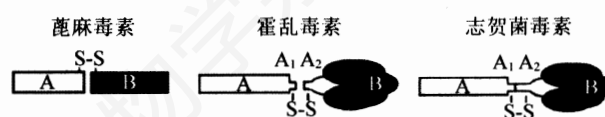


图1 三种核糖体失活蛋白的结构^[3]

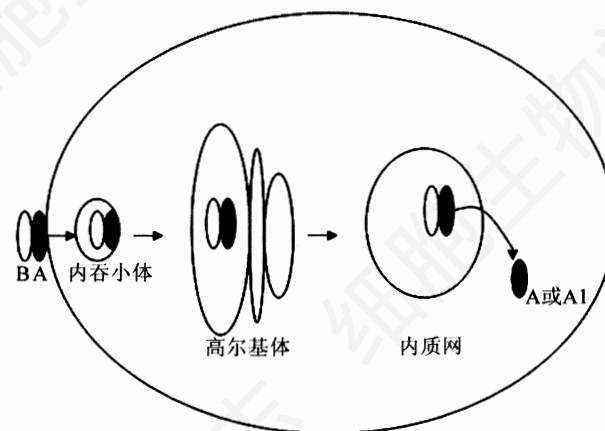


图2 核糖体失活蛋白在细胞内的逆向转运途径^[2]

的转运仍在继续, 说明蓖麻毒素进入细胞是不依赖网格蛋白和细胞膜膜容的^[8], 它的B链含有两个半乳糖或半乳糖残基结合位点, 可和细胞表面的含半乳糖残基的受体(糖脂或糖蛋白)结合。

绝大部分志贺菌毒素的受体是糖脂Gb3, 不仅糖基对毒素结合重要, 而且脂的乙酰链也起着积极的作用^[9,10]。毒素-糖脂受体复合物转运到网格蛋白包被区域似乎由毒素自身介导, 因为在低温条件下复合物仍可以在细胞表面分布。志贺菌毒素结合到

收稿日期: 2005-03-21 接受日期: 2005-06-17

国家自然科学基金(No.30270294 和 No.30070166)和浙江省自然科学基金(No.301057)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0571-87217154, E-mail: jzhan2k@cmm.zju.edu.cn

细胞表面和细胞对毒素的敏感性由许多因子调控,其感染多种类型的细胞诱导产生的细胞因子(白介素1和肿瘤坏死因子)能促使Gb3的合成,这将有助于毒素发挥作用^[11]。

在多种类型细胞的细胞膜膜窖中能观察到霍乱毒素,然而它只是保留在细胞膜膜窖里,并没有被内吞,这可能是细胞膜膜窖里含有高浓度的霍乱毒素受体的原因。在HeLa K44A细胞中引入能抑制细胞膜膜窖和网格蛋白依赖性内吞的突变动力蛋白(dynamin),霍乱毒素的内吞将减少50%~70%,由于该种细胞几乎不含细胞膜膜窖,从而表明霍乱毒素大部分是通过网格蛋白依赖性内吞途径内吞。同样,在BHK细胞中,如果引入反义网格蛋白重链,网格蛋白依赖性内吞被阻断,内吞会降低50%以上。另外,霍乱毒素聚集在网格蛋白包被小泡的过程需要酪氨酸激酶的参与,使用Genestein(一种酪氨酸激酶抑制剂)将抑制霍乱毒素的内吞^[12]。

1.2 从内吞小体到高尔基体

RIPs内吞后既可以直接转运到胞液中,也可以经过高尔基体、内质网,最后到达胞液。有趣的是受体的脂类组成对该转运过程很重要,是受体的脂质成分决定了RIPs的转运途径。

从内吞小体到高尔基体的胞内转运不止一条,其中依赖Rab9路线是比较具有特色的,它介导晚期内吞小体(late endosomes)到高尔基体的转运,该过程需要6-磷酸甘露糖受体,有一种高尔基体相关蛋白TGN38能包围晚期内吞小体,并将毒素转运到高尔基体,如志贺菌毒素^[9]。但实验证明蓖麻毒素是从早期内吞小体(early endosomes)进入高尔基体,且不依赖Rab9路线,这可以通过显微镜观察和选择性抑制Rab9依赖途径加以证实^[4]。在动力蛋白表达突变的细胞中,由于动力蛋白的突变,蓖麻毒素向高尔基体的运输被阻断,表明蓖麻毒素在从内吞小体向高尔基体转运的过程中可能存在一条依赖动力蛋白的转运路线^[13]。

志贺菌毒素在循环内吞小体(recycling endosomes)的网格蛋白包被的区域被发现,其B链的转运需要小分子GTP结合蛋白(small GTP-binding protein) Rab11和Rab6a^[14],而蓖麻毒素进入高尔基体似乎不依赖功能性的网格蛋白分子和Rab11^[15]。Birkeli等报道^[16]:依赖cAMP的蛋白激酶的II α 型调节亚基(RII α)可以调节蓖麻毒素的逆向转运。在表达RII α 的细胞中,当蛋白激酶A活化时,蓖麻毒素向高尔

基体的运输速度提高,促进其向内质网的转运。本实验室研究表明^[17]:在蓖麻毒素A链(ricin A chain, RTA)的C端连接YQRL(一种高尔基体保留信号肽, Tyr-Gln-Arg-Leu)将显著提高RTA的细胞毒性。此外细胞中胆固醇的含量和Ca²⁺/钙调蛋白均可调节蓖麻毒素的转运^[13,8,18,19]。志贺菌毒素和霍乱毒素向高尔基体的运输同样依赖胆固醇在细胞中的含量^[20,21]。用丁酸处理细胞可以增强细胞对志贺菌毒素的敏感性,在A431细胞中首次得到证明^[22],后来被用于多种细胞中^[10]。cAMP也有类似的功能。许多细胞因子和生长因子在不同的细胞中既可以合成志贺菌毒素受体也可以改变胞内转运路线来提高对该毒素的敏感性^[12]。

霍乱毒素被快速地运输到高尔基体,其具体机制可能与志贺菌毒素相同^[12],还有待于进一步研究。

1.3 从高尔基体到内质网: 依赖和非依赖COP I途径

高尔基体内最典型的逆向转运途径是依赖外壳蛋白I(coat protein I, COPI)的途径。COPI是一种包裹在高尔基体膜上出芽生成的小泡的高分子蛋白复合物,它负责转运含有KDEL(一种内质网保留信号肽, Lys-Asp-Glu-Leu)或类似KDEL序列的蛋白质毒素,如霍乱毒素。当突变该序列时将影响毒素的生物活性。有证据表明霍乱毒素AB两亚基在高尔基体分离,只有A亚基通过与KDEL的受体ERD2结合转运到内质网^[23]。

对于不含KDEL序列的RIPs,如蓖麻毒素、志贺菌毒素,就不能象霍乱毒素那样通过依赖COPI和KDEL受体途径从高尔基体转运到内质网。人们曾假设这类RIPs不与KDEL受体结合,而是直接被转运到COPI包被小体内,然而当COPI依赖性转运被其抗体抑制后,志贺菌毒素的逆向转运仍在进行,证明先前的假设是错误的^[24,25]。另有实验发现当温度从34℃升到39.5℃时,1d1F细胞对蓖麻毒素的敏感性提高了6倍,因此COPI在温度增高时的功能损伤不但没有抑制其毒性,反而有所增强,表明COPI损伤对蓖麻毒素从细胞表面到胞液的转运没有影响。该方法证实了COPI非依赖性途径的存在^[26]。志贺菌毒素已被证实是依赖Rab6A逆向转运途径进入内质网,由此人们推测蓖麻毒素可能也是通过该途径进入内质网^[27]。但最新研究表明在Rab6A和COPI均被抑制的条件下,蓖麻毒素的逆向转运和毒性作用也不受影响,意味着蓖麻毒素

在转运到内质网的过程中不依赖 Rab6A 和 COPI^[28]。天然的志贺菌毒素只与膜糖脂 Gb3 而不与 ERD2 结合,其他研究结果也说明该毒素运输到内质网受 Gb3 结构的影响^[29],这与毒素转运到内质网是糖脂而不是蛋白质分选途径的观点相一致。志贺菌毒素在此过程中还受丁酸和 cAMP 调节^[27]。

1.4 具有酶活性的部分进入胞液:内质网相关的蛋白质降解途径

RIPs 进入内质网后,内质网固有的分子伴侣和酶将有助于 RIPs 内部二硫键的断裂,为 A 亚基进入胞液发挥细胞毒性做好准备。目前研究得比较清楚的是内质网相关的蛋白质降解途径(ER-associated protein degradation pathway, ERAD)。内质网的质量控制体系能够保证蛋白质折叠成天然构象,对于错误折叠的蛋白质不能保留在细胞内,而是通过该途径转运到胞液中被蛋白酶水解。内质网中的 RIPs 的二硫键被一种二硫异构酶解开,部分展开的 A 亚基与内质网膜上的带负电荷的膜脂相互作用,并作为 ERAD 的底物通过 Sec61 通道(由 Sec α 、Sec β 和 Sec γ 三个亚基组成,在正常细胞中 Sec61 蛋白复合体负责将新合成的蛋白质转运到内质网腔中,同时也起着把错误折叠的蛋白质甚至糖蛋白从内质网倒退运输到胞液,并通过泛素化和蛋白酶降解)被转运到胞液中。与错误折叠的蛋白质相比,具有酶活性部分的 RIPs 是十分稳定的,它们不会被蛋白酶迅速降解,这可能是由于赖氨酸含量很低的缘故,因为低含量的赖氨酸可以防止泛素化和泛素介导的蛋白酶水解(泛素化可以调节蛋白质的降解,是 2004 年诺贝尔化学奖的主要工作)。有报道证明当以不影响 RTA 活性、结构、稳定性的方式在其上附加 4 个赖氨酸残基时,RTA 的降解速度明显加快^[30,31]。最新研究表明蓖麻毒素内部二硫键的切割不仅需要蛋白质二硫键异构酶 PDI,硫氧还蛋白还原酶也必不可少,谷胱甘肽的存在则更能提高该还原作用的效率^[32]。进入胞液的 RTA 小部分被蛋白酶水解,大部分在完整的核糖体诱导下重新折叠,则可以作用于核糖体 28S rRNA,发挥其细胞毒性功能^[33]。霍乱毒素运输到胞液的机制与蓖麻毒素类似。待进入内质网后,PDI 切断其二硫键,释放具有活性的 A1 亚基,再通过 Sec61 通道到达胞液^[34]。Teter 等^[35]发现霍乱毒素不仅输出速度快,而且在胞液中的降解也很迅速。尽管 A1 亚基只含有极少量的赖氨酸残基,蛋白酶的水解仍然继续,表明在细胞内存在一

个泛素不依赖的机制对毒素起降解起作用。志贺菌毒素也依靠酶切 A 部分,从而生成游离的具酶活性的 A1 片段,该过程通常需要高尔基体内的弗林蛋白酶介导^[9]。与蓖麻毒素相比,霍乱毒素和志贺菌毒素不发生糖基化,这可能更有利于转运到胞液。

2 其他转运途径

除了逆向转运途径外,核糖体失活蛋白还存在一些其他的转运方式。如白喉毒素就是内吞后进入内体,然后直接转位进入胞液中,在穿越细胞膜时受鞘磷脂调节^[36]。I 型核糖体失活蛋白也有其独特的转运方式。天花粉蛋白通过特异性和非特异性内吞作用两种方式进入细胞^[37]:大部分是与细胞膜上的 α_2 -巨球蛋白受体特异性结合,形成内吞小泡进入细胞,该过程可被受体相关蛋白抑制^[38]。内吞体与溶酶体融合形成多泡体,继续向胞内转运,并在粗面内质网附近和胞液的其他区域释放天花粉蛋白。同时还有极少量的天花粉蛋白不与受体结合而直接进入细胞。Ready 等^[39]用电子显微镜研究了美洲商陆蛋白抗体在美洲商陆细胞壁间的定位,发现细胞壁和细胞膜的渗漏和破裂可以让美洲商陆蛋白进入胞内,从而抑制蛋白质的合成,其具体的转运途径和转位机制有待进一步研究。

3 小结

近年来,由于 RIPs 的分布广泛,并具有良好的抗肿瘤和抗病毒,已逐渐成为毒素领域的研究热点,相信随着分子生物学和细胞生物学技术的进步,RIPs 在细胞内的转运途径将会得到更加深入的研究,并为其开发利用提供重要的理论依据。

参考文献 (References)

- [1] Sharma S et al. *Mol Cell Biochem*, 1999, **200**: 133
- [2] Falnes PO et al. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, **12**: 407
- [3] Sandvig K et al. *FEBS Lett*, 2002, **529**: 49
- [4] Sandvig K et al. *Histochem Cell Biol*, 2002, **117**: 131
- [5] Schapiro FB. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 21025
- [6] Sandvig K. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2002, **18**: 1
- [7] Lencer WI. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, **280**: G781
- [8] Sandvig K et al. *EMBO J*, 2000, **19**: 5943
- [9] Sandvig K. *Toxicol*, 2001, **39**: 1629
- [10] Paton JC et al. *Clin Microbiol Rev*, 1998, **11**: 450
- [11] Hughes AK et al. *Kidney Int*, 2000, **57**: 2350
- [12] Torgersen ML et al. *J Cell Sci*, 2001, **114**: 3737
- [13] Llorente A et al. *J Cell Biol*, 1998, **140**: 553
- [14] Mallard F et al. *J Cell Biol*, 2002, **156**: 653

- [15] Iversen TG *et al. Mol Biol Cell*, 2001, **12**: 2099
[16] Birkelik A *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 1991
[17] Zhan J *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **313**: 1053
[18] Spilsberg B *et al. Traffic*, 2003, **4**: 544
[19] Grimmer S *et al. Mol Biol Cell*, 2000, **11**: 4205
[20] Falguieres T *et al. Mol Biol Cell*, 2001, **12**: 2453
[21] Shogomori H *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 9182
[22] Sandvig K *et al. Physiol Rev*, 1996, **76**: 949
[23] Lencer WI *et al. Trends Biochem Sci*, 2003, **28**: 639
[24] Girod A *et al. Nat Cell Biol*, 1999, **1**: 423
[25] White J *et al. J Cell Biol*, 1999, **147**: 743
[26] Chen A *et al. Biochim Biophys Acta*, 2002, **1589**: 124
[27] Day PJ *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 7202
[28] Chen A *et al. J Cell Sci*, 2003, **116**: 3503
[29] Arab S *et al. J Cell Physiol*, 1998, **177**: 646
[30] Lord JM *et al. Biochem Soc Trans*, 2003, **31**: 1260
[31] Lehner PJ *et al. Curr Biol*, 2000, **10**: R839
[32] Bellisola G *et al. Biochem Pharmacol*, 2004, **67**: 1721
[33] Argent RH *et al. J Biol Chem*, 2000, **275**: 9263
[34] Tsai B *et al. Cell*, 2001, **104**: 937
[35] Teter K *et al. Infect Immun*, 2002, **70**: 6166
[36] Spilsberg B *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **329**: 465
[37] Chan WY *et al. Toxicology*, 2003, **186**: 191
[38] Chan WL *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **270**: 453
[39] Ready MP *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**: 5053

Transport of Ribosome-inactivating Proteins in the Cell

Feng Wang, Jin-Biao Zhan*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Zhejiang University Medical School, Hangzhou 310031, China)

Abstract Ribosome-inactivating proteins (RIPs) are a group of protein toxins which inhibit protein synthesis in cells. Recently RIPs have been used as molecular probes in cell biology and as anti-cancer and antiviral drugs in clinic. In this review, we focus on the intracellular trafficking and translocation of RIPs based on research recent years.

Key words ribosome-inactivating proteins; intracellular trafficking; retrograde transport; translocation

Received: March 21, 2005 Accepted: June 17, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30270294 and No.30070166) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.301057)

*Corresponding author. Tel: 86-571-87217154, E-mail: jzhan2k@cmm.zju.edu.cn