

细胞核质转运受体 Importin β 家族与转运调控

王 潇 王玉鹏 全 宇 纪志梁 陶 涛*

(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 核质转运是真核细胞的基本生命活动之一。Importin β 家族的蛋白质成员作为核质转运的受体, 负责细胞内大部分蛋白质和核酸等生物大分子的跨核膜运输。同时, 细胞通过多种方式对核质转运的过程进行精确调控, 使底物能够在正确的时间与空间发挥功能, 保证细胞增殖与分化的正常进行。核质转运的失调, 则使得底物不能正常执行功能, 导致个体发育的异常与疾病的发生。

关键词 核质转运; importin β ; RanGTP; 调控; 疾病

由于真核细胞的基因复制、转录与蛋白质的表达翻译在细胞内分区进行, 蛋白质及核酸等生物大分子跨核膜转运成为细胞中最重要的生物学功能之一。一般而言, 分子量小于 50 kDa 的分子可以自由扩散的方式通过核孔复合体(nuclear pore complex, NPC), 而分子量大于 50 kDa 的生物大分子只能以主动运输的方式进行核质转运^[1], 这一过程主要是由 importin β 家族的蛋白质成员负责完成的。

1 核质转运受体 importin β 家族成员及其结构特点

Importin β 家族成员是一类真核生物中广泛分布的核质转运受体蛋白。迄今为止, 在人类细胞中发现超过 20 个成员, 酵母细胞中大约 14 个(表 1)。这些家族成员在功能上保守, 在蛋白质序列上具有较低的相似性; 分子量大约在 95~145 kDa 之间; 结构上都具有保守的 N 端 Ran 结合结构域(IBM_N Domain)和多个 (<20) HEAT Repeats 结构域 (Swiss-Prot 数据库)。HEAT (Huntingtin, Elongation factor 3, the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A and TOR1)是由连续重复的 37~46 个氨基酸组成的一种螺旋形棒状结构单元。而 HEAT Repeats 由多个这样的单元叠加形成具有延展性的超螺旋, 可以通过构象改变为相互作用的蛋白质提供丰富的结合位点。通过这种特殊的结构, importin β 家族成员可以使用 C 端结合底物(cargo)^[2] 或接头蛋白(adaptor)^[3], N 端结合 RanGTP^[4], 中部结合核孔蛋白(Nups)^[5],

从而将底物带入或带出细胞核。

一个物种的 importin β 家族成员的数目有限, 在哺乳动物中也只有 20 个左右, 而被转运的底物种类却极其繁多。事实上, 在细胞内一种受体将负责转运多种底物(表 1)。为何一种转运受体可以结合多种不同的底物? 通过对 importin β 的晶体结构分析, 人们发现它的 HEAT Repeats 超螺旋结构域可以伸展或收缩, 改变各种构象以配合结构不同的底物。并且 importin β 可以使用 4 种接头蛋白来识别不同类型的底物(表 1)。由此可见, 结构的延展性与接头蛋白的多样性, 使得一个受体可以拥有广泛的底物类型^[6], 这样就协调了少数受体与大量底物之间的矛盾。

大多数 importin β 家族成员可以直接识别底物的核定位信号(nuclear location signal, NLS) 或出核信号(nuclear export signal, NES)并与底物结合。而 importin $\beta 1$ 却需要使用接头蛋白来识别并结合特定类型的底物(表 1), 如: importin α 作为 importin $\beta 1$ 的一种接头蛋白, 负责识别并结合具有经典核定位信号的底物, 再通过其 N 端的 IBB (importin β binding) 结构域与 importin $\beta 1$ 结合。importin $\beta 1$ 参与随后的与核孔蛋白 Nups 或 Ran 蛋白的相互作用^[7]。

2 核质转运受体介导的蛋白质入核与出核机制

收稿日期: 2006-01-19 接受日期: 2006-06-15
国家自然科学基金(No.3047085)和福建省自然科学基金(No. C0510003)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0592-2182880, E-mail: taotao@xmu.edu.cn

表1 人类与酵母 importin β 家族成员及相应底物与功能(部分摘录于文献[8]和[9])

人类	底物	酵母	底物	必需基因
核输入受体				
importin β / 接头蛋白		Kap95/ 接头蛋白		
importin β/α	有经典 NLS 的蛋白质	Kap95/Srp1p	有经典 NLS 的蛋白质	
Importin β /snurportin	有 m3G 帽子的 U snRNPs			
Importin β /XRIP	复制蛋白 A (RPA)			
Importin $\beta/7$	H1 组蛋白, rpL4 核糖体蛋白, GR			
Importin $\beta 1$ (kpnb1)	可直接转运底物, 如: 核心组蛋白, 核糖体蛋白, HIV Rev/Tat, PTHrP, SRY, CREB 等	Kap95	可直接转运底物, 如: 组蛋白等	是
Transportin 1 (tnpo 1)	核心组蛋白,核糖体蛋白, HuR, TAP, hnRNP-A1,-A2-F	Kap104	mRNA 结合蛋白 Nab2, Nab4, Hrp1, hnRNPs, AlcR, Nop1p	Ts
Transportin 2	HuR, hnRNPA1, ACF		
Transportin 3	RS 结构域被磷酸化的 SR 蛋白	Mtr10/Kap111	mRNA 结合蛋白: Np13, Hrb1	Ts
Importin 4	核心组蛋白,核糖体蛋白 rpS3A	Yrb4/ Kap123	核心组蛋白 H3/H4, 核糖体蛋白, Sas2p, Sas5p, Yap1p, NAC	否
Importin $\beta 3$ (ranbp 5)	核心组蛋白, 核糖体蛋白(rpS7, rpL23a, rpL5), TAF(1)48	Pse1/Kap121	核心组蛋白, Sas2p, Sas5p, SRP,Yra1, Spo12, Ste12p, Yap1, Pho4, Nop1p, NAC, Pdr1, Cdh1p	是
Importin 7	核心组蛋白, 核糖体蛋白, HIV RTC, GR,	Nmd5/Kap119 Sxm1/ Kap108	TFIIS, Hog 1, AlcR, Ssa4 Crz1, 核糖体蛋白, Lhp1, Pab1, GR	否 否
Importin 8	SRP19, GR		
Importin 9	核心组蛋白,核糖体蛋白(rpS7, rpL4, rpL6), PPP2R1A/B	Kap114	H2A, H2B, rpS7, rpL18A, rpL4, rpL6, TBP, Sua7, Nap1p	否
Importin 11	rpL12, UbcM2, UbcH6, UbcH8	Kap120 Pdr6/ Kap122	rpL11b, Elongator, Rpf1 RNR, TFIIA	否
核输出受体				
Crm1	富含亮氨酸 NES 蛋白质	Crm1	富含亮氨酸 NES 蛋白质	是
Exportin-t	tRNA	Los1	tRNA	否
CAS	Importin α	Cse1	importin α	是
Exportin 4	eIF-5A, VDR		
Exportin 5	ILF3 与 Minihelix RNA/pre-miRNA/ shRNA;eEF1A 与乙酰化 tRNA, Stau2 与双链 RNA		
Exportin 6	肌动蛋白单体隔离蛋白与肌动蛋白 复合物 (profilin/actin complex)		
Exportin 7	P50Rho-GAP, 14-3-3 δ		
双向转运受体				
Importin 13	核输入: Rbm8, Ubc9, Pax6, NF-YB/ NF-YC 二聚体 核输出: eLF-1 A		
.....		Msn5/Kap142	核输出: Pho4, Far1, Cdh1, Rtg1, Rtg3,Crz1, Msn2, Swi6, Mig1, Pik1 等磷酸化蛋白 核输入: 复制蛋白 RP A complex	否
尚未分类				
RanBP6	功能不明		
RanBP17	功能不明		

Ts: 温度敏感; Srp1p: 芽殖酵母中 importin α 的同源蛋白; 别名: importin $\beta 1$ /kpnb 1; importin $\beta 2$ /transportin 1/tnpo 1; importin $\beta 3$ /ranbp 5; transportin 3/transportin SR/Trn SR; Crm1/exportin 1。

作为核质转运受体的 importin β 家族成员负责细胞内大多数的蛋白质和 RNA 的跨核膜运输。根据转

运方向不同, 它们可被分为介导底物(cargo)入核转运的核输入受体(importin), 与介导底物出核转运的

核输出受体(exportin), 也有即可介导底物核输入也可介导底物核输出的双向转运受体(bidirection receptor), 如 importin 13^[10]。

2.1 核质转运的基本过程

蛋白质大分子的入核转运首先发生在细胞质中。细胞核输入受体(importin)在胞质内识别底物的 NLS, 并与之结合形成二聚体, 携带底物穿过核孔复合体进入细胞核内, 在核内 RanGTP 的作用下, “核输入受体-底物”二聚体发生解聚, 底物被释放在核内, 而“核输入受体-RanGTP”复合物通过 NPC 重返细胞质, 并在胞质内 RanGTP 水解为 RanGDP, 使得核输入受体在胞质中被释放, 开始新一轮的入核转运^[7,9,11](图 1)。

细胞核内生物大分子的出核转运则由核输出受体(exportin)来执行。在核内核输出受体与 RanGTP 结合之后才能识别并结合具有 NES 的相应底物。“核输出受体-底物-RanGTP”三聚体穿越 NPC 到达胞质侧, 在胞质内 RanGTP 发生水解, 导致三聚体解聚, 从而底物被释放到细胞质内^[7,9,11](图 1)。

2.2 Ran 蛋白在核质转运过程中的作用

Ran 是一种小分子的 GTP 酶, RanGTP 与核输入受体结合导致底物的释放, 与核输出受体结合促使底物的结合。研究发现, RanGTP 结合使底物与核输入受体解聚的原因在于 RanGTP 的结合改变了核输入受体的构象, 从而影响了底物与核输入受体的亲和力。在 RanGTP 促使 importin α 与 importin β

解聚的例子中, RanGTP 首先结合在 importin β 1 的 C 端 HEAT Repeats 1~4, 随后 RanGTP 的 I 环(I loop)结构域深入到 HEAT Repeat 8 的内部, 引起了 HEAT Repeats 7~19 螺旋面的斜率增大, 该区域正是 importin β 1 与 importin α 的 IBB 结构域结合的部位, 该区域构象的改变破坏了 importin β 1 与 IBB 的紧密结合, 导致 importin α 被释放。并且 RanGTP 将空受体 importin β 1 牢牢“锁定”, 使其不能延展 HEAT Repeats 超螺旋以结合其他的底物^[12]。

Ran 在结合 GTP 与 GDP 二种形态之间转变。核内 RanGTP 的浓度约是胞质中的 500 倍, 而 RanGDP 则相反^[13]。胞质内的 RanGDP 通过核转运因子 2 (nuclear transport factor 2, Ntf2)转运至核内, 与核内的 Ran 鸟嘌呤交换因子(Ran-guanine nucleotide exchange factor, RanGEF or RCC1)相互作用, 转变为 RanGTP。RanGTP 随核质转运受体出核后, 被胞质内的 RanGTP 酶激活蛋白(RanGTP-activating protein, RanGAP)和辅助因子(Ran-binding protein 1/2, RanBP1/2)水解成为 RanGDP^[7], 从而开始新一轮转运。RanGEF 定位在染色体组蛋白 H2A 与 H2B 上, 而 RanGAP 主要定位在核膜外侧。细胞内 RanGEF 与 RanGAP 的这种严格的分区定位, 造成了 RanGTP 在核质间剧烈的浓度梯度, 为核质转运提供了重要的方向指导^[7]。

2.3 辅助因子在核质转运过程中的作用

一些辅助因子可以协助核质转运机器共同完成

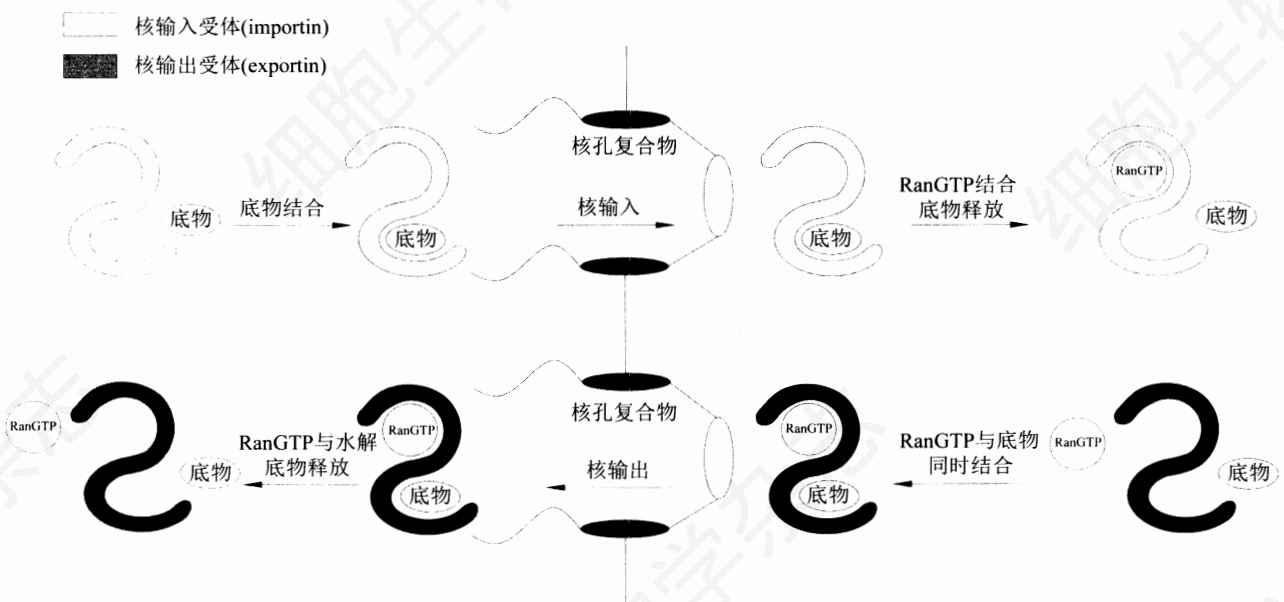


图 1 细胞核质转运模式图(根据文献[6, 7, 11, 12]绘制)

底物的跨核膜运输。例如：在肌动蛋白的核输出的过程中一种肌动蛋白抑制蛋白(profilin)起到协助的作用。纯化的肌动蛋白易形成多聚体，与核输出受体 exportin 6 的结合作用十分微弱。而肌动蛋白抑制蛋白的存在使肌动蛋白保持单体与可溶的状态，大大增加了肌动蛋白与 exportin 6 的亲合力，从而“肌动蛋白抑制蛋白-肌动蛋白”(profilin-actin)复合物被共转运出核^[14]。

当神经细胞受到损伤时，信号通过狭长的胞体迅速传达至核内对于神经细胞的及时修复是至关重要的。波形蛋白(vimentin)(中间纤维的一种)在这一过程中起到重要的协助作用。最新的研究发现，当坐骨神经的轴突受到损伤时，受损轴突处的 MAP 激酶 Erk1 与 Erk2 被磷酸化，立刻被波形蛋白携带，波形蛋白同时结合 importin β 1 与动力蛋白(dynein)形成四聚体(Erki-vimentin-importin β 1-dynein)。此四聚体由波形蛋白捆绑由动力蛋白推动迅速沿着微管逆行至细胞核，波形蛋白才释放此复合物。接着 importin β 1 将 Erk1 或 Erk2 转运入核，启动神经细胞的修复功能^[15]。

由此可见，一些辅助因子对于核质转运高效地、顺利地进行也是不可或缺的。

2.4 核质转运过程中分子伴侣的功能

通常带正电荷的蛋白质(如组蛋白与核糖体各亚基)，遇到带负电荷的生物大分子(如 DNA, RNA)时，会迅速发生沉淀，形成大的包涵体。因此当

碱性蛋白质在细胞质充满各种离子的环境中被翻译出来后，就立刻面临着多聚化形成包涵体的危险。研究发现，importin β 家族的成员在转运底物的同时，也担负着遮蔽其正电荷基团以防止其沉淀的分子伴侣中的功能^[16,17]。

例如：组蛋白 H1 是细胞内碱性最强的蛋白质之一，importin β /7 异源二聚体在胞质中结合新生成的 H1 组蛋白，遮蔽其正电荷基团防止与其他离子相互作用。直到 H1 被安全转运入核，结合染色质 DNA 后才被释放。已经证明 importin β /7 是细胞内转运组蛋白 H1 的唯一的受体组合^[16]。

虽然某些蛋白质可通过多种受体介导核质转运(表 2)，但是不同受体转运同一底物的效率不同，这是由于每种受体对特定碱性底物的正电荷基团的遮蔽能力不同造成的。例如：强碱性的核糖体小亚基蛋白 rpS3a 在不含有 importin 的细胞裂解液发生严重的沉淀现象。分别加入一定量的 importin 4a, ranbp 5 或 importin β /7 后，都可以使 rpS3a 不同程度地恢复溶解，而 importin4a 的效果最显著。并且在洋地黄皂苷通透细胞核质转运试验(digitonin-permeabilized cell transport assays)中，只有 importin 4a 才能有效地防止 rpS3a 在胞质中形成包涵体，并将其转运入核^[17]。虽然 ranbp 5 和 importin β /7 可以在体外与 rpS3a 结合，但是在真实的胞浆环境中只有 importin 4a 才能精确地遮蔽其正电荷，最大效率地转运 rpS3a。

表 2 通过多个受体转运的底物总结表

底物	入核受体						参考文献
组蛋白	H1	importin β /7	importin 7				[16, 33, 34]
	H2A	importin β 1	importin 7	importin 9	ranbp 5	tnpo 1	[33,35]
	H2B	importin β 1	importin 7	importin 9	ranbp 5	tnpo 1	[33, 35]
	H3	importin β 1	importin 7	importin 9	ranbp 5	tnpo 1	[33, 35]
	H4	importin β 1	importin 7	importin 9	ranbp 5	tnpo 1	[33, 35]
核糖体蛋白	rpL12	importin 11					[36]
	rpL18A	importin 9					[17]
	rpL23A	importin β 1	importin 7	ranbp 5	tnpo 1		[37]
	rpL4	Importin β /7	importin 9				[16]
	rpL5	importin β 1	importin 7	ranbp 5	tnpo 1		[37]
	rpL6	importin 9					[17]
	rpS3A	importin 4					[17]
rpS7	importin β 1	importin 7	importin 9	ranbp 5	tnpo 1	[17, 37]	
rRNA 转录因子	TAF(1)48	importin β 1	ranbp 5	tnpo 1			[38]
糖皮质激素受体	GR	importin α / β	importin 7	importin 8	importin 13		[27, 39]
真核翻译起始因子	eIF-1A	exportin5	importin 13				[10, 40]
转运 RNA	tRNA	exportin-t	exportin 5				[40, 41]
RNA 结合蛋白	HuR	tnpo 1	tnpo 2				[42, 43]
核异质性核糖核蛋白	hnRNP A1	tnpo 1	tnpo 2				[43]

功能不同的碱性蛋白质, 其正电荷基团的结构亦不同。这就要求有多种核质转运受体才能将各种结构不同的碱性底物精确地掩蔽, 这或许是 importin β 家族拥有如此众多不同的家族成员的原因之一^[17]。

3 核质转运的调控机制

细胞可通过多种胞内、外信号调控底物的核质转运过程, 这些信号包括: 激素、细胞因子、生长因子、免疫刺激与胁迫等。细胞对核质转运的精确调控使得底物的分布具有时间性和空间性, 以保证底物的功能得以正常发挥, 这对细胞生命活动的正常进行具有重要的意义。

3.1 直接对 NLS/NES 进行修饰

直接对底物的 NLS/NES 进行磷酸化、乙酰化、糖基化等修饰, 是细胞内最常见的核质转运调控方式。例如: 睾丸决定因子 SRY 在靠近 C 端 NLS 处的 K136 赖氨酸残基, 是调控其与 importin $\beta 1$ 相互作用的关键位点^[18]。在体内与体外实验中组蛋白乙酰转移酶 p300 能够使 K136 赖氨酸残基乙酰化, 从而使得它与 importin $\beta 1$ 的结合力增强了 3 倍多。在谷胱苷肽-S- 转移酶沉淀试验(GST-pull down assay)中, HeLa 细胞裂解液中突变的 K136R SRY 不能被 p300 乙酰化, 从而不能与固定的 GST-importin $\beta 1$ 结合, 而可以被乙酰化的野生型的 SRY 能够结合在珠子上。通过小 RNA 干扰(siRNA)消除 HeLa 细胞中的 p300, SRY 因不能被乙酰化而堆积在核的外周。同样, 使用 HDAC3 去乙酰化导致 SRY 滞留在细胞质中。由此可见, 乙酰化和去乙酰化是调节 SRY 核质转运的关键因素^[19]。

人类细胞巨化病毒 DNA 多聚酶磷酸蛋白 ppUL44 在病毒 DNA 复制过程中起重要作用。在其 NLS 上游 Ser413 处有一个 CK2 激酶的位点, 磷酸化该位点增强了 ppUL44 与 importin α/β 的结合能力, 从而提高了其转入宿主细胞核内的效率。若将 Ser413 位点突变, 或者使用 CK2 的激酶抑制剂, 使该位点不能被磷酸化, 则抑制了 ppUL44 的核输入, 使病毒不能启动 DNA 复制^[20]。

3.2 同种类的蛋白质之间形成二聚体或多聚体

被转运的同种类蛋白质之间通过形成同源或异源多聚体, 使 NLS/NES 出现或遮蔽, 从而实现核质转运的调控。例如: NF-Y 转录因子的 2 个亚基 NF-YB 与 NF-YC 都不能以单体的形式进行核输

入, 只有通过其保守的组蛋白折叠结构域(HFM)形成二聚体, 才能被 importin 13 识别并转运入核。这是由于单体的 NF-YB 或 NF-YC 的 HFM 结构域都不具有 NLS 的信号功能, NLS 只出现在 2 个相互作用的 HFM 结构域中^[21]。同样, 转录活化因子(STATs)也只有通过酪氨酸磷酸化形成 STAT1-STAT1 或 STAT1-STAT2 二聚体, 位于其 DNA 结合结构域中的 NLS 才能被 importin α/β 识别并转入核内^[22]。肿瘤抑制因子 p53 的一个 NES 存在于形成四聚体的结构域中。当发生 DNA 损伤时, p53 立即四聚化, 从而遮蔽了 NES, 使得 p53 在核内积累^[23]。

3.3 胞质或核质锚固

待转运的底物被另一个蛋白质锚定在胞质或核质中, 当细胞受到信号刺激时, 锚固被解除, 底物才可以进行核质转运。NF- κ B 是免疫应答转录因子。当细胞处于静息状态时, NF- κ B 二聚体被其抑制蛋白 I κ B 锚固于胞质中, I κ B 遮蔽了 NF- κ B 的 NLS, 使其处于无活性状态。当细胞受到各种免疫刺激后, I κ B 被磷酸化, 随之进行泛素化降解^[24]。NF- κ B 被释放, NLS 暴露, 随之被 importin α/β 转运入核激活靶基因的答应^[25]。糖皮质激素受体(GR)与之类似, 在没有配体存在的条件下 GR 与热休克蛋白(HSP)90 形成二聚体以无活性的状态存在于细胞质中^[26]。当 GR 被配体激活后, 就从 HSP90 的锚固中释放出来, 被 importin α/β , importin 7 或 importin 8 转运入核^[27], 在核内调控靶基因的表达。当配体降解后, GR 又被核内的 HSP90 锚固在核质中^[28], 从而延长了滞留在核内的时间。

3.4 第二信使 Ca^{2+} 的调控作用

许多胞外信号通过一系列胞内反应, 导致细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高, 进而影响了核质转运。磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) δ 亚型在磷脂酰肌醇(phosphoinositides, PIs)信号通路中发挥作用, 主要分布在胞质与质膜中。当用 Ca^{2+} 载体离子霉素(ionomycin)处理 MDCK 与 PC12 细胞时, 细胞内 Ca^{2+} 的浓度升高, 引起了内生的 PLC $\delta 1$ 聚集在核内。在体外实验中 PLC $\delta 1$ 与 importin $\beta 1$ 的结合也依赖于 Ca^{2+} 。一个在 Ca^{2+} 结合结构域(catalytic core)内发生突变的 PLC $\delta 1$ E341A, 在任何浓度的 Ca^{2+} 条件下都不能与 importin $\beta 1$ 结合。在 MDCK 细胞内表达 PLC $\delta 1$ E341A, 用 Ca^{2+} 载体离子霉素处理后, 突变蛋白质不能转运入核。这些结果都表明, Ca^{2+} 调控 PLC $\delta 1$ 的入核转运^[29]。SOX9 是哺乳动物性别决定

过程中的重要转录因子,只有当CaM与SOX9 N端保守的CaM结合结构域结合后,C端的入核信号才能被importin β 1识别并转入核内。CaM与SOX9的结合是Ca²⁺依赖性的,若使用Ca²⁺螯合剂CDZ处理细胞,CaM不能与SOX9结合,导致SOX9滞留在胞质内^[30]。

3.5 受配体调控的膜蛋白的核输入

以前被认为定位在细胞质膜上的蛋白质,最近也在核内发现了它们的踪影,这些质膜蛋白的入核转运往往是其受配体调控的。例如:成纤维细胞生长因子受体1(FGFR1)是一个定位在质膜上的受体蛋白,受到配体FGF-2的激活后,FGFR1与质膜分离,被importin β 转运入核,增强c-Jun的表达量,促进细胞的增殖^[31]。酪氨酸激酶受体ErbB-2的核转运方式与FGFR1不同,ErbB-2横跨细胞质膜,受配体激活后通过内吞作用形成内吞小泡,importin β 结合内吞小泡表面的ErbB-2,将小泡带至核外周,与核孔复合体蛋白Nup358瞬间作用而将ErbB-2转运入核^[32]。

3.6 多个转运受体的调控

某些重要的底物往往通过多种受体介导核质转运,以保证转运效率与底物浓度能够满足细胞生命活动的需要(表2)。这些受体之间存在怎样的相互关系(竞争、互补、平行)目前尚不清楚,推测可能在某一发育时期某一组织器官中,某种转运受体将具有转运该底物的优势。多种受体的核质转运方式保证了重要的底物能够迅速及时地转运到正确的位置并积累足够的浓度,以发挥底物相应的生物学功能。

4 核质转运的调控对细胞生命活动的影响

细胞生命活动的顺利进行有赖于各种有功能的蛋白质能够“各司其职”,而蛋白质“职能”的发挥与其在细胞内的“职位”密切相关。因此,通过核质转运调控各种底物在细胞内的分布从而起到调节其功能的作用,进而影响细胞的生命活动。

4.1 影响基因的转录调控

基础转录起始复合物元件(如TBP, TAF3, TAF8, TAF10^[44], TAF(I)48^[38])与为数众多的转录因子(如NF-Y^[21], STAT1^[22], Smad3^[45], RXR^[46])都是importin β 家族成员的底物。转录因子能够在准确的时间进出细胞核行使基因调控的功能,得益于核质转运过程的精确调控,从而使细胞能够对不同的胞内、外信

号产生及时与准确的应答。

例如:在静息态的细胞内,STAT1与NF- κ B都以无活性的状态定位在胞质中^[24,47]。当细胞遇到炎症反应时, γ 干扰素(IFN- γ)释放。细胞受到刺激后,NF- κ B从I κ B的锚固中释放出来,被importin α/β 转入核内^[25]。同时STAT1也迅速被磷酸化而成为二聚体,被importin α/β 识别并转入核内^[47]。在核内STAT1与NF- κ B共同增强趋化因子(CXC ligand 9, CXCL9)基因的表达,以对抗炎症反应^[48]。在这一过程中,核质转运的精确调控保证了2个重要的转录因子都能及时地入核参与细胞的免疫应答。然而,一个L407A突变型的STAT1,虽然可以响应IFN- γ 的刺激而形成二聚体,也能够结合基因组DNA,但却不能在核内执行基因调控的功能。这是因为L407A位点的突变影响了STAT1与importin α 的识别,从而无法被正确地转运入核内^[47]。可见核质转运对于基因调控具有重要意义。

4.2 影响细胞周期的进程

参与细胞周期调控的蛋白质在核、质内的分布与浓度,对于发挥其周期调控的功能至关重要。许多参与细胞周期调控的蛋白质是核质转运受体的底物,例如:细胞周期蛋白及其激酶复合物cyclin H^[49], cyclin E/Cdc2^[50], cyclin B1/Cdc2^[50]等。精确调控这些蛋白质在核、质内的分布与浓度,直接影响着细胞周期的进程。例如:后期促进复合物(anaphase-promoting complex, APC/C)通过促使M期周期蛋白和后期抑制因子进行泛素化途径降解,从而使细胞进入有丝分裂的后期。Cdh1p是APC/C的一个底物特异性的接头蛋白,负责识别底物并将底物带至APC/C进化泛素化标记。其重要底物之一是有丝分裂周期蛋白Clb2p。在细胞周期S期Cdc28p-Clb5p周期蛋白激酶复合物的活性升高,Cdh1p被磷酸化,随之被exportin 5(酵母Msn5)转运出核^[51,52]。Cdh1p的出核导致APC/C^{Cdh1}失活,从而使Clb2p不能被降解,Clb2p在核内浓度的升高导致M期的开始^[51,53]。在有丝分裂后期,Cdc28p-Clb5p激酶的活性降低,Cdh1p发生去磷酸化而重返核内,导致核内M期周期蛋白Clb2p降解,后期随之到来。Clb2p的降解从后期持续到整个G₁期,直到下一个S期随着Cdh1p再次被磷酸化而转运出核才停止^[53],从而完成了一个细胞周期的调控。由此可见,对细胞周期相关蛋白核质转运的调控影响着细胞周期的进程。

4.3 影响细胞的分化与个体的发育

在细胞分化的过程中, 参与细胞分化的转录因子需要进入核内才能激活分化相关基因的转录; 而分化结束后, 这些转录因子即离开核区或者进行降解。因此通过调控这些分化相关转录因子的核质转运, 可以激活或关闭相应基因的表达, 从而影响细胞的分化与个体的发育。

Y 染色体编码的睾丸决定因子 SRY 在小鼠 10.5~11.5 天胚胎的尿生殖嵴部位细胞中高表达且定位于核内, 启动睾丸的发育; 而在成体体细胞中 SRY 定位在细胞质中, 以防止体细胞发生错误的分化。组蛋白乙酰转移酶 p300 能够使 SRY 乙酰化, 随之进行核输入。相反, HDAC3 去乙酰化使 SRY 滞留在细胞质中。采用免疫印迹与免疫组化方法发现在小鼠的 10.5 天胚胎睾丸组织内 p300 高表达且明显聚集在核内, 而 HDAC3 也有相似的分布。这种分布上的一致性或许可以推测在睾丸形成的早期 p300 与 HDAC 共同调控 SRY 的细胞内定位, 促进睾丸形成与发育^[19]。

睾丸发育过程中的另一个重要的转录因子 SOX9 的核输入对于睾丸支持细胞(sertoli cell)的分化也是至关重要的。当睾丸细胞系 NT2/D1 受到雄性特异的前列腺素(prostaglandin) D2 刺激时, 蛋白激酶 A (PKA) 磷酸化 SOX9 的 Ser64 与 Ser181 丝氨酸残基, 大大增加了 SOX9 与 importin β 1 的亲和力, 从而 SOX9 被转入核内, 启动睾丸支持细胞的分化^[54]。

5 核质转运与疾病发生及药物研发的关系

蛋白质在细胞内的正确定位与其功能的正常发挥密切相关。因此若蛋白质的核质转运受到干扰, 将影响底物功能的发挥, 最终导致疾病的发生。至今为止, 没有在核质转运机器(包括核质转运受体, Ran 及相关调控因子等)中发现致病的突变, 这也显示出核质转运机器在细胞生命活动中的基础性与重要性^[9]。而在某些底物蛋白中发生的突变, 破坏了底物与核质转运受体的亲和力, 导致核质分布异常, 从而引发各种疾病。

5.1 癌症发生

细胞的恶性增殖导致癌症的发生。许多参与细胞增殖与调亡的蛋白质若不能通过核质转运进行正确的定位, 将导致对细胞的生长失去控制, 甚至引发癌症。例如: 作为抑癌因子的 p27 只有在细胞核内才能抑制周期蛋白激酶复合物(cyclin-CDK complex) 的活性。研究发现, 在 41% (52/128) 人类原发性

乳腺癌中有 p27 的胞质滞留现象, 并伴随着蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 的活化^[55]。位于 p27 的 NLS 内的 Thr157 苏氨酸残基是 Akt 激酶的磷酸化位点, 在乳腺癌细胞中该位点被 Akt 持续磷酸化^[56]。而 14-3-3 对 Thr157 磷酸化的 p27 有很强的亲和力, 从而竞争性抑制了 p27 与 importin α/β 的结合, 使 p27 滞留在细胞质中^[57]。核内缺乏 p27 导致 CDK 激酶的活性失去控制, 废除了 p27 介导的 G₁ 期阻滞, 进而引起肿瘤的发生^[56]。

5.2 发育异常

细胞分化相关的转录因子若不能通过核质转运在细胞内正确定位, 将导致个体发育的异常。在哺乳动物性别决定的过程中, SOX9 必须转入睾丸支持细胞核中才能启动睾丸的发育。SOX9 的入核转运是 CaM 依赖性的。一个 XY 型“女性”病人的 SOX9 发生了 A158T 的突变, 突变的 SOX9 A158T 结合 CaM 时的构象与野生型 SOX9-CaM 相比发生了很大的改变。所以虽然 SOX9 A158T 仍可结合 importin β 1, 却不能被转运入核, 从而导致核内缺乏 SOX9, 不能激活睾丸形成相关基因的表达^[30]。与之类似, 4 个性腺不育的 XY 型病人的 SRY 在 NLS 内部有突变, 影响了与 importin β 1 的亲和力, 从而大大降低了 SRY 的核输入。由此可见, 发育相关的蛋白质核质转运的失常往往是多种发育异常疾病的原因^[58]。

5.3 病毒通过核质转运机器进入宿主细胞核

病毒在宿主中繁殖时需要将自己的遗传物质 DNA/RNA, 以及转录、复制的相关病毒蛋白以及部分病毒结构蛋白输入宿主细胞核内。大部分病毒蛋白使用了宿主的核质转运机器以完成自身的运输过程。例如: 人类 HIV-2 病毒基因组输入蛋白 Vpx^[59], 人类乙肝病毒的核心蛋白^[60], 登革热病毒的 RNA 聚合酶 NS5^[61], 疱疹病毒的 RNA 核输出蛋白 ORF57^[62], 都可通过自身的 NLS 与 importin α/β 结合被带入细胞核内。HIV 的反转录复合物(RTC)通过 importin 7 或 importin7/ β 介导入核^[63]。

通过阻止病毒蛋白与核质转运机器的结合, 使病毒蛋白不能入核执行相应功能, 可以抑制病毒的繁殖。例如: Tat 是人类 HIV-1 病毒的调节蛋白, 通过作用于长末端重复序列(LTR)来调节病毒基因的转录强度。Tat 通过 importin β 1 入核是基因调控的先决条件。在体外实验中发现人类 MyoD 家族蛋白 (I-mfa) 的抑制子(HIC)可与 Tat 结合, 体内实验发现

HIC 与 Tat 在细胞内共定位, 并且 HIC 将 Tat 滞留于胞质内, 阻止 Tat 入核, 从而抑制了 HIV-1 病毒的复制^[64]。

5.4 针对核质转运进行药物研发

针对细胞内定位错误的蛋白质, 人们正在研究使它们能重返正确位置的药物。例如: 细胞核输出抑制剂柔红霉素 B (leptomycin B, LMB) 可以特异性阻断 Crm1 (chromosome region maintenance 1 protein homolog, exportin 1) 依赖的核输出途径, 从而具有成为一种治疗性药物的可能。在大部分宫颈癌细胞中, 抑癌因子 p53 并没有发生突变^[65], 但却在人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)蛋白 HPV E6 的诱导下迅速通过 CRM1 出核, 并进行泛素化降解^[66], 导致细胞核内不能积累足够量的 p53 以执行负向调控细胞生长的功能。当使用 LMB 与顺式铂氨 (cisplatin, CDDP) 联合处理 HPV18 感染的 HeLa 与 HPV16 感染的 SiHa 宫颈癌细胞时, 发现具有转录活性的 p53 在核内明显积累, 直到引起 p53 介导的细胞凋亡^[65], 从而达到消除癌细胞的目的。

干扰病毒蛋白与核质转运输器的结合可以阻止病毒蛋白入核, 进而抑制病毒的增殖。Hariton-Gazal 等^[67]研发出了一种环肽文库(backbone cyclic peptides library), 这些短肽都具有 HIV-1 病毒 mRNA 输出蛋白 Rev 的精氨酸富集结构域(ARM), 可以有效地在体外抑制 Rev 与 importin β 1 的结合, 并在 HeLa 细胞中抑制了 60%~70% 的由 Rev 引起的病毒基因转录水平, 而且没有细胞毒性。充分显示了该肽链文库作为治疗 HIV-1 病毒感染药物的前景。

6 小结与展望

Importin β 家族成员介导真核细胞内大部分蛋白质、RNA 等生物大分子的核质转运过程。importin β 家族成员通过其特殊的 HEAT Repeats 超螺旋结构可以分别结合接头蛋白, RanGTP, 核孔蛋白及多种不同的底物。细胞通过直接修饰 NLS/NES、二聚化或多聚化、胞质与核质锚固、Ca²⁺ 浓度等多种方式对底物的核质转运过程进行调控, 使得底物在时间与空间上精确分布。底物正确的亚细胞定位与其正常的功能发挥密切相关。通过对底物核质转运的精确调控影响着细胞的基因转录, 周期运转, 增殖分化等生命活动。而核质转运失调将导致底物在细胞内的错误定位, 使底物的功能不能正常发挥, 从而导致癌症、发育异常等多种疾病。许多病毒也

是通过宿主细胞的核质转运输器转运自身的蛋白质。人们正针对调控底物亚细胞定位的因素研制开发药物, 有望新的药物够有效地治疗核质转运失常引起的疾病。

参考文献(References)

- [1] Pante N *et al.* *Mol Biol Cell*, 2002, **13**: 425
- [2] Lee SJ *et al.* *Science*, 2003, **302**: 1571
- [3] Cingolani G. *et al.* *Nature*, 1999, **399**: 221
- [4] Chook YM *et al.* *Nature*, 1999, **399**: 230
- [5] Bayliss R *et al.* *Cell*, 2000, **102**: 99
- [6] Mosammaparast N *et al.* *Trends Cell Biol*, 2004, **14**:547
- [7] Weis K. *Cell*, 2003, **112**: 441
- [8] Harel A *et al.* *Mol Cell*, 2004, **16**: 319
- [9] Pemberton LF *et al.* *Traffic*, 2005, **6**: 187
- [10] Mingot JM *et al.* *EMBO J*, 2001, **20**: 3685
- [11] Gorlich D. *EMBO J*, 1998, **17**: 2721
- [12] Lee SJ. *Nature*, 2005, **435**: 693
- [13] Smith AE *et al.* *Science*, 2002, **295**: 488
- [14] Stuvven T *et al.* *EMBO J*, 2003, **22**: 5928
- [15] Perlson E *et al.* *Neuron*, 2005, **45**: 715
- [16] Bauerle M *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 32480
- [17] Jakel S *et al.* *EMBO J*, 2002, **21**: 377
- [18] Forwood JK *et al.* *J Biol Chem*, 2001, **276**: 46575
- [19] Thevenet L *et al.* *EMBO J*, 2004, **23**: 3336
- [20] Alvisi G *et al.* *Traffic*, 2005, **6**: 1002
- [21] Kahle J *et al.* *Mol Cell Biol*, 2005, **25**: 5339
- [22] Fagerlund R *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 30072
- [23] Stommel JM *et al.* *EMBO J*, 1999, **18**: 1660
- [24] Traenckner EB *et al.* *EMBO J*, 1994, **13**: 5433
- [25] Fagerlund R *et al.* *J Biol Chem*, 2005, **280**: 15942
- [26] Pratt WB *et al.* *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi*, 1990, **66**: 1185
- [27] Freedman ND *et al.* *Mol Biol Cell*, 2004, **15**: 2276
- [28] Tago K *et al.* *Mol Cell Endocrinol*, 2004, **213**: 131
- [29] Okada M *et al.* *FEBS Lett*, 2005, **579**: 4949
- [30] Argentaro A *et al.* *J Biol Chem*, 2003, **278**: 33839
- [31] Reilly JF *et al.* *J Cell Biol*, 2001, **152**: 1307
- [32] Giri DK *et al.* *Mol Cell Biol*, 2005, **25**: 11005
- [33] Baake M *et al.* *Eur J Cell Biol*, 2001, **80**: 669
- [34] Jakel S *et al.* *EMBO J*, 1999, **18**: 2411
- [35] Muhlhauser P *et al.* *EMBO Rep*, 2001, **2**: 690
- [36] Plafker SM *et al.* *Mol Cell Biol*, 2002, **22**: 1266
- [37] Jakel S *et al.* *EMBO J*, 1998, **17**: 4491
- [38] Dynes JL *et al.* *J Biochem (Tokyo)*, 2004, **135**: 429
- [39] Tao T *et al.* *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, in press
- [40] Bohnsack MT *et al.* *EMBO J*, 2002, **21**: 6205
- [41] Arts GJ *et al.* *EMBO J*, 1998, **17**: 7430
- [42] Guttinger S *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 2918
- [43] Rebane A *et al.* *RNA*, 2004, **10**: 590
- [44] Soutoglou E *et al.* *Mol Cell Biol*, 2005, **25**: 4092
- [45] Kurisaki A *et al.* *Mol Biol Cell*, 2001, **12**: 1079
- [46] Yasmin R *et al.* *J Biol Chem*, 2005, **280**: 40152
- [47] McBride KM *et al.* *EMBO J*, 2002, **21**: 1754
- [48] Hiroi M *et al.* *J Biol Chem*, 2003, **278**: 651
- [49] Krempler A *et al.* *Cell Mol Life Sci*, 2005, **62**: 1379

- [50] Moore JD *et al. J Cell Biol*, 1999, **144**: 213
[51] Yeong FM *et al. Mol Cell Biol*, 2001, **21**: 5071
[52] Huang JN *et al. J Cell Biol*, 2001, **154**: 85
[53] Jaquenoud M *et al. EMBO J*, 2002, **21**: 6515
[54] Malki S *et al. EMBO J*, 2005, **24**: 1798
[55] Liang J *et al. Nat Med*, 2002, **8**: 1153
[56] Viglietto G *et al. Nat Med*, 2002, **8**: 1136
[57] Sekimoto T *et al. EMBO J*, 2004, **23**: 1934
[58] Harley VR *et al. Novartis Found Symp*, 2002, **244**: 57
[59] Singhal PK *et al. J Virol*, 2006, **80**: 526
[60] Kann M *et al. J Cell Biol*, 1999, **145**: 45
[61] Brooks AJ *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 36399
[62] Goodwin DJ *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 19905
[63] Fassati A *et al. EMBO J*, 2003, **22**: 3675
[64] Gautier VW *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 16362
[65] Naniwa J *et al. Cancer Sci*, 2003, **94**: 1099
[66] Stewart D *et al. J Virol*, 2005, **79**: 8773
[67] Hariton-Gazal E *et al. Biochemistry*, 2005, **44**: 11555

Nuclear Transport Receptor, Importin β Family Proteins, and the Regulation Mechanisms in Nucleocytoplasmic Transport

Xiao Wang, Yu-Peng Wang, Yu Quan, Zhi-Liang Ji, Tao Tao*

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

Abstract Nucleocytoplasmic transport of macromolecules is mediated by the soluble transport receptors collectively named importin β super family proteins. RanGTP regulates the interactions between the receptors and cargos. In this review, we describe the structural features of importin β family proteins and possible regulation mechanisms in nucleocytoplasmic transport of large molecules, such as modulating the NLS/NES directly by phosphorylation, or covering the NLS/NES domain through polymerization. The precise regulation of nucleocytoplasmic transport brings cargos to the correct subcellular locations, which is essential for the cargos' cellular functions such as gene transcription regulation, cell cycle regulation, cell differentiation and proliferation. Disruption of the nuclear import/export processes will result in the mislocation of cargoes, therefore causing developmental disorder and diseases.

Key words nucleocytoplasmic transport; importin β ; RanGTP/GDP; disease

Received: January 19, 2006 Accepted: June 15, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.3047085) and the Natural Science Foundation of Fujian Province (No.C0510003)

*Corresponding author. Tel: 86-592-2182880, E-mail: taotao@xmu.edu.cn