

组蛋白磷酸化的机制及其作用研究进展

赵树靛 房静远*

(上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所, 上海 200001)

摘要 组蛋白磷酸化是组蛋白修饰方式之一, 属表观遗传修饰的一种。各种不同亚型的组蛋白磷酸化分别参与了基因转录、DNA 修复、细胞凋亡及染色体浓缩等过程, 与组蛋白的乙酰化等其他修饰方式一起在细胞的生长、分裂等一系列生命活动中起调控作用。

关键词 组蛋白磷酸化; 组蛋白修饰; 染色质; 细胞周期

组蛋白磷酸化属于表观遗传范畴, 系指对组蛋白 N 端氨基酸残基的磷酸化修饰。物理学研究显示, 磷酸化能破坏组蛋白与 DNA 间的相互作用, 而使染色质结构不稳定。这样一种不稳定性对细胞有丝分裂时染色质凝集成为同源染色体过程中的结构重组是必要的。总的来说, 组蛋白磷酸化修饰和其他表观遗传修饰一样也可能是通过两种机制影响染色体的结构和功能: ①磷酸基团携带的负电荷中和了组蛋白上的正电荷, 造成组蛋白与 DNA 之间亲和力的下降; ②修饰能够产生与蛋白质识别模块(protein recognition modules)结合的表面, 与特异的蛋白质复合物相互作用。组蛋白磷酸化与染色体的浓缩/分离、转录的激活、细胞凋亡以及 DNA 损伤的修复均有关。组蛋白分为核小体核心组蛋白(H2A、H2B、H3、H4)和核小体连接蛋白(H1)五种, 对不同组蛋白的磷酸化的作用也不尽相同。本文分别对其作用及机制的研究进展作一综述。

1 组蛋白 H3 磷酸化

目前已知的组蛋白 H3 的磷酸化主要在其第 10、28 位丝氨酸(Ser10/Ser28)和第 3、11 位苏氨酸(Thr3/Thr11)上。

1.1 H3 磷酸化与细胞分裂

组蛋白 H3 的 Ser10 在 G₂ 期初始阶段会发生磷酸化, 从而进一步影响基因转录的起始和有丝分裂期染色体浓缩时形态结构的改变。如: 果蝇热休克基因的调节就伴随 Ser10 的大量磷酸化; 而用表皮生长因子(EGF)刺激静息期的成纤维细胞, 组蛋白 Ser10 在 Rsk-2 激酶的催化下迅速被磷酸化, 同时还伴随早期反应基因 *c-fos* 的诱导表达。科-勒二氏综合征(Coffin-Lowry syndrome, CLS)是一种 Rsk-2 基因缺陷的 *c-fos* 转录活性受损和 EGF 诱导的 H3 磷酸化的

缺失而导致的疾病。对该类患者的皮肤成纤维细胞研究发现, 添加 EGF 处理, 既没有 *c-fos* 催化的磷酸化也没有 EGF 诱导的一系列反应^[1]。

最初仅发现 Ser10 磷酸化与染色体的浓缩和分离有关^[2], 而随着研究的进展已发现其越来越多的其他作用^[3]。H3 Ser10 的磷酸化开始于细胞分裂前期, 在分裂中期达到高峰, 在分裂末期随着整体磷酸化水平的下降而下降^[2]。减数分裂中也可见类似现象, 如在嗜热四膜虫中 H3 Ser10 的缺失会抑制减数分裂的进行^[6]。在有丝分裂中组蛋白磷酸化始于臂间异染色质, 在 G₂/M 转变期扩展到整个基因组^[7]。细胞磷酸化酶上有能与 Ser10 相结合的活性位点, 在生理状态下, 两者能在 G₂/M 交界期相互结合, 如果用显微注射的方法将带有 Ser10 序列的多肽注入 S 期的细胞, 使这类活性位点达到饱和, 那么细胞将阻滞在 G₂ 晚期。这一现象虽然并不能直接说明 Ser10 磷酸化在 G₂/M 转化期中是必须的, 但至少说明 Ser10 磷酸化酶在该期是起关键作用的^[8]。更深入的分析显示, 在组蛋白 H3 Ser10 突变(丝氨酸被丙氨酸替代)的四膜虫中, 不仅染色体浓缩发生变化, 染色体分离也出现异常^[9]。有丝分裂中 H3 磷酸化也许是染色体浓缩的起始阶段所必需的。不过这种作用可能与物种相关: 在酵母中这种磷酸化就不是必须的, 同时 H2B 的磷酸化也显得多余^[10]。而在玉米的研究中发现, H3 Ser10 的磷酸化发生在有丝分裂和减数分裂前期, 且在染色体浓缩启动后, 因此其似乎不是与染色体浓缩(condensation)相关, 而是与染色体凝聚(cohesion)相关^[11]。有丝分裂特异性的 H3 磷酸化还可发生在 Ser28 和 Thr11 上^[4,5], 目前还不清楚这些修饰之间是

收稿日期: 2008-08-12 接收日期: 2008-12-12

* 通讯作者。Tel: 021-63200874, Fax: 021-63266027, E-mail: jingyuanfang@yahoo.com

否有因果关系。

目前已发现 aurora 激酶(aurora kinase, ArK)家族与 H3 Ser10 的磷酸化有关^[12]。这些激酶的活性对 H3 磷酸化依赖型的凝缩复合物的适当募集和纺锤体的正确组装是必须的。这类激酶作用与 1 型磷酸酶(PP1)相反, 而磷酸酶是有丝分裂中控制 H3 磷酸化的主要途径。因此, H3 磷酸化的调节是通过包括 ArK 家族和 PP1 等各种酶的相互作用来实现的, 最终促进恰当的染色体浓缩和分离。

1.2 H3 磷酸化与转录: 快速诱导的修饰

1991 年 Mahadevan 等^[13]描述了用生长因子等刺激成纤维细胞而出现的核小体反应(伴随着 *c-fos* 和 *c-jun* 早期应答基因出现的快速 H3 磷酸化), 并发现 H3 磷酸化的时间进程能反映已知基因的表达谱, 从而猜想 H3 和转录活性间存在关联。进一步的研究表明, 这种外来刺激下产生的 H3 磷酸化是快速而短暂的, 能影响一类不同于在正常分裂细胞中能检测到的磷酸化的 H3。同时, 这种 H3 的磷酸化水平与乙酰化水平呈正相关, 说明在通过 MAPK 途径的转录激活中, 这两种组蛋白修饰可能是成对出现的。用卵泡刺激素(FSH)处理幼鼠的卵巢颗粒细胞能产生蛋白激酶 A 依赖性的快速的 H3 磷酸化, 说明 H3 磷酸化在细胞分化途径确立的过程中起一定作用, 且基因分化也涉及其中。另外, 用光脉冲刺激大鼠视交叉上核(SCN)也能诱导 H3 磷酸化, 并且其分布的改变与早期即刻基因(immediate early gene, IE 基因) *c-fos* 及昼夜节律基因 *Per1* 转录谱的改变一致; 而用多巴胺等激动剂进行神经元激活后会出现类似的 H3 Ser10 磷酸化及基因表达的改变。这些也为 H3 Ser10 磷酸化在基因表达中的作用提供了证据。

2 组蛋白 H4 磷酸化

目前对组蛋白 H4 磷酸化的研究主要集中在 Ser1 上。

2.1 H4 Ser1 磷酸化的发生时间

Krishnamoorthy 等^[14]报道了 H4 Ser1 在进入孢子形成期 8~12 h 后出现的大量的磷酸化。H4 Ser1 磷酸化与 H3 Ser10 磷酸化不同的是, 后者在孢子形成的早期出现高峰, 随后即下降; 而前者则出现在减数分裂 I、II 期的终末, 且此后一直维持高水平, 只在孢子发芽后才出现下降。由此可知, H3 Ser10 的磷酸化出现于孢子形成早期, 而 H4 Ser1 的磷酸化则激活于孢子发芽后, 与孢子形成无关。此外, 当二

倍体细胞 H4 Ser1A 中丙氨酸取代了 1 位丝氨酸后会对孢子形成产生障碍, 但是作用于 H4 其他残基的突变对孢子形成没有影响, 说明 Ser1A 突变对孢子形成的影响并不是由于 H4 非特异性的修饰。基于上述结果, 如果在二倍体细胞中用天冬氨酸 Asp 代替 H4 中 Ser1 是否会引起与孢子形成有关的染色质的紧密呢? 类似的假设都还需要进一步的研究证实。

2.2 H4 Ser1 磷酸化的 SPS1 依赖性

色氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 SMK1/SPS1 属于孢子形成中期蛋白, 与包括染色质凝集在内的减数分裂的机制相关, 其中 SPS1 为 H4 Ser1 磷酸化所需。SPS1 基因水平的高峰出现于孢子形成的中期(相当于 H4 Ser1 磷酸化出现的时间), 此后就出现下降, 而 H4 Ser1 的磷酸化水平在 SPS1 消失后仍然维持, 故有人猜测 H4 Ser1 磷酸化是孢子形成中恰当的染色质紧密度所必需的稳定的分子标志。此外, 虽然孢子形成过程中的 SPS1 的缺失会导致 H4 Ser1 丧失, 但是在体外用细菌无法模拟出 SPS1 对 H4 的磷酸化作用, 因此, SPS1 可能不是直接催化 H4 Ser1 的磷酸化; 或者, 也可能是 SPS1 需要通过一种未知的翻译后修饰或某种辅蛋白的激活才具有催化磷酸化的功能, 正如其他的染色质修饰酶如 RAD6/BRE1 需要辅因子的参与才能发挥功能一样^[15]。还有一个似是而非的说法是, 其他的染色质翻译后修饰是 SPS1 对 H4 Ser1 磷酸化的必要条件, 而类似交叉调节(cross-talk)的方式在染色质领域已是确定存在的。对 H4 Ser1 磷酸化所需的关键因子的检测将会进一步揭示这一过程的分子机制, 并且了解 SPS1 对 H4 Ser1 是否有直接的磷酸化作用。

2.3 H4 Ser1 的磷酸化的作用

虽然大量组蛋白 Western 印迹结果说明磷酸化的 H4 Ser1 在孢子形成过程中是一个稳定的分子标志, 但是染色质免疫共沉淀(ChIP)的结果显示同源染色体中 H4 Ser1 的稳定性有待商榷: SPS1 和磷酸化的 H4 Ser1 在染色质中均有广泛定位, 且在孢子形成特异性的基因和染色体组的其他部位富集; 然而, 当进入孢子形成期后, 其丰度就出现了持续性的下降; 其丰度的高峰出现在孢子形成的 10 h 内, 且到 24 h 已出现下降。为了解释 Western 印迹和 ChIP 结果的差异, 研究者分别检测了野生株和 *sps* 缺失株, 以判断 ChIP 结果中 H4 Ser1 磷酸化的缺失是否是由于染色质紧密性而使其难以接近相关分子。他们发现在 *sps1* 缺失的情况下, H3 和 H4 ChIP 的信号比野生株要高, 说明磷酸化 H4 Ser1 的丧失能降低染色质的紧

密性, 并使其更易接近组蛋白。此外, 在 *sps1* 缺失或 H4Ser1A 替代突变的情况下胞核的容积会增大, 这一现象进一步证实了此结论。

3 组蛋白 H2A/H2B 磷酸化

H2 的磷酸化也和减数分裂时染色质的凝聚相关。该过程中丝氨酸发挥了重要功能, 例如, 组蛋白 H2A Ser10 突变的四膜虫在细胞分裂时表现出异常的染色质凝集和分离。最近发现, 酵母中的 Ipl1 激酶和构巢曲霉中的 NIMA 激酶与 10 位丝氨酸的磷酸化有关, 上述两种激酶表达异常会造成染色质凝集和分离的异常, 减数分裂后 H3 会在 Glc7/PP1 的作用下发生去磷酸化反应; 而由 Mist1 激酶催化的 H2B Ser14 部位的磷酸化则发生在人 HL-60 细胞的凋亡过程中。Mst1 催化的鸡和人类细胞 H2B Ser14 磷酸化与凋亡中的染色体压缩和 DNA 双螺旋的崩解有关。甚至有人认为, H2B 磷酸化是 DNA 双螺旋崩解、凋亡、有丝分裂和转录激活的关键步骤, 但具体机制还未被阐明^[10,16,17]。

组蛋白 H2 部位的磷酸化也和 DNA 的损伤修复机制有关。如酵母和人体中 H2A 的突变体 H2AX 在 DNA 诱变剂的作用下会迅速发生磷酸化。该反应是在 Mec1 的催化下发生的, 与 139 位的丝氨酸位点有关, 是 DNA 损伤的高效修复所必需的。这说明磷酸化介导了染色体结构的变化, 这种变化对损伤修复有利。

H2A 的变体 H2AX Ser139 上的磷酸化与 DNA 损伤, 尤其是涉及 DNA 双链结构断裂的损伤有关。Ser139 磷酸化的 H2AX 称为 γ -H2AX, 它与一些信号蛋白和修复蛋白有相同的定位, 如 M/R/N 复合物(Mre11/Rad50/Nbs1)、Brca1 和 p53 结合蛋白 1(53BP1)等。此外, DNA 损伤能通过其 Ser139 的磷酸化激活毛细血管扩张性共济失调突变(ataxia telangiectasia mutated, ATM)蛋白, 该酶的底物即为 H2AX, 而 ATM

诱导的 H2AX 磷酸化与 DSBs 的激活密切相关。ATM 的活化和 DSBs 的磷酸化可以作为 DSBs 诱导激活的有力证据和 DNA 损伤的标志。

4 组蛋白 H1 磷酸化

H1 的磷酸化与细胞周期进程相关, 在 G_1 期时水平很低, 随着有丝分裂的进行逐渐增高至最高峰, 但是癌基因转化的细胞或者 *Rb* 缺失的细胞会出现 G_1 期 H1 磷酸化水平的升高。在分裂间期和有丝分裂期, H1 的磷酸化是非随机性的, 且 H1 每个亚基在细胞周期中的磷酸化程度是不同的^[18]。对人 T 细胞的研究显示, 在所有亚型(H1.5、H1.4、H1.3、H1.2)中, 分裂间期的磷酸化只发生在丝氨酸残基上^[19]。对 H1.5 的分析发现, 在分裂间期的主要磷酸化受体在 Ser17 位^[18]。

一般认为, H1 磷酸化的作用是中和正电荷, 削减其与 DNA 的结合力, 使染色质结构不稳定。但目前发现, H1 磷酸化和染色质凝集间可能不是单一的联系: 中期染色体中高度凝集的染色质中包括高度磷酸化的连接组蛋白, 而在成熟的有核红细胞中高度凝集的染色质中则包括低磷酸化的连接组蛋白; 同样, 细胞化学 DAPI 法结果显示, 在原位的染色质中, 连接组蛋白的表面亲和力与染色质凝集无关, 中期染色体和成熟的蛙红细胞中有结合疏松的连接组蛋白, 而成熟的鸡红细胞中的连接组蛋白则结合紧密^[20]。因此, 连接组蛋白的亲和力及染色质的凝集可能受多种水平的调控, 包括连接组蛋白亚型的构成及其磷酸化的水平, 其他的核因子等。但是, 在体外以 H1 磷酸化为唯一变量的情况下, 磷酸化会降低其在染色质中的亲和力。此外, 在体内研究中发现, H1 磷酸化水平的增高会增加 H1 的动态活性^[21]。

5 总结与展望

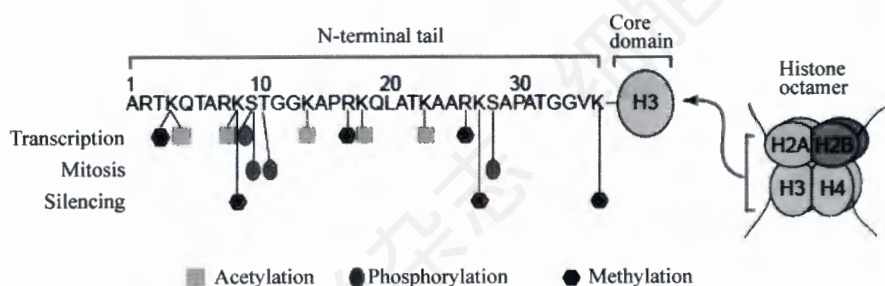


Fig.1 Modification of the histone H3 N-terminal tail domain ^[22]

随着组蛋白磷酸化研究的深入,它在基因转录、DNA 修复、细胞凋亡及染色质凝集等过程中的调控作用越来越多地被发现。组蛋白修饰是表观遗传学研究的重要内容,组蛋白中被修饰氨基酸的种类、位置和修饰类型被称为组蛋白密码,它决定了基因表达调控的状态。不同类型的修饰在细胞生命活动中各个时期出现,发挥其各自的作用,推进其生命活动的进行(以 H3 为例,图 1^[22])。对包括组蛋白磷酸化在内的组蛋白修饰的研究亦将继续成为从表观遗传学角度窥探生命奥秘的窗口。

参考文献(References)

- [1] Cho YY, Yao K, Kim HG, *et al.* Ribosomal S6 kinase 2 is a key regulator in tumor promoter induced cell transformation, *Cancer Res*, 2007, 67(17): 8104-8112
- [2] Gurley LR, D'Anna JA, Barham SS, *et al.* Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells, *Eur J Biochem*, 1978, 84: 1-15
- [3] Ito T. Role of histone modification in chromatin dynamics, *J Biochem*, 2007, 141(5): 609-614
- [4] Lee K, Song K. Basal c-Jun N-terminal kinases promote mitotic progression through histone H3 phosphorylation, *Cell Cycle*, 2008, 7(2): 216-221
- [5] Casas-Mollano JA, Jeong BR, Xu J, *et al.* The MUT9p kinase phosphorylates histone H3 threonine 3 and is necessary for heritable epigenetic silencing in *Chlamydomonas*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(17): 6486-6491
- [6] Au WC, Crisp MJ, DeLuca SZ, *et al.* Altered dosage and mislocalization of histone H3 and Cse4p lead to chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, 2008, 179(1): 263-275
- [7] Eberlin A, Grauffel C, Oulad-Abdelghani M, *et al.* Histone H3 tails containing dimethylated lysine and adjacent phosphorylated serine modifications adopt a specific conformation during mitosis and meiosis, *Mol Cell Biol*, 2008, 28(5): 1739-1754
- [8] Swain JE, Ding J, Brautigan DL, *et al.* Proper chromatin condensation and maintenance of histone H3 phosphorylation during mouse oocyte meiosis requires protein phosphatase activity, *Biol Reprod*, 2007, 76(4): 628-638
- [9] Song L, Li D, Liu R, *et al.* Ser-10 phosphorylated histone H3 is involved in cytokinesis as a chromosomal passenger, *Cell Biol Int*, 2007, 31(10): 1184-1190
- [10] Kang TH, Park DY, Choi YH, *et al.* Mitotic histone H3 phosphorylation by vaccinia-related kinase 1 in mammalian cells, *Mol Cell Biol*, 2007, 27(24): 8533-8546
- [11] Zhang W, Lee HR, Koo DH, *et al.* Epigenetic modification of centromeric chromatin: hypomethylation of DNA sequences in the CENH3-associated chromatin in *Arabidopsis thaliana* and maize, *Plant Cell*, 2008, 20(1): 25-34
- [12] Song L, Li D, Liu R, *et al.* Ser-10 phosphorylated histone H3 is involved in cytokinesis as a chromosomal passenger, *Cell Biol Int*, 2007, 31(10): 1184-90
- [13] Hazzalin CA, Mahadevan LC. Dynamic acetylation of all lysine 4-methylated histone H3 in the mouse nucleus: analysis at c-fos and c-jun, *PLoS Biol*, 2005, 3(12): e393
- [14] Krishnamoorthy T, Chen X, Govin J, *et al.* Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis, *Genes Dev*, 2006, 20(18): 2580-2592
- [15] Wood A, Schneider J, Dover J, *et al.* The Bur1/Bur2 complex is required for histone H2B monoubiquitination by Rad6/Bre1 and histone methylation by COMPASS, *Mol Cell*, 2005, 20(4): 589-599
- [16] Cheung WL, Ajiro K, Samejima K, *et al.* Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase, *Cell*, 2003, 113(4): 507-517
- [17] Ayoub N, Jeyasekharan AD, Bernal JA, *et al.* HP1- β mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response, *Nature*, 2008, 453(7195): 682-686
- [18] Sarg B, Helliger W, Talasz H, *et al.* Histone H1 phosphorylation occurs site-specifically during interphase and mitosis: identification of a novel phosphorylation site on histone H1, *J Biol Chem*, 2006, 281(10): 6573-6580
- [19] Sarg B, Gr  n A, S  derkvist P, *et al.* Characterization of sequence variations in human histone H1.2 and H1.4 subtypes, *FEBS J*, 2005, 272(14): 3673-3683
- [20] Rao J, Bhattacharya D, Banerjee B, *et al.* Trichostatin-A induces differential changes in histone protein dynamics and expression in HeLa cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 363(2): 263-268
- [21] Deterding LJ, Bunger MK, Banks GC, *et al.* Global changes in and characterization of specific sites of phosphorylation in mouse and human histone H1 isoforms upon CDK inhibitor treatment using mass spectrometry, *J Proteome Res*, 2008, 7(6): 2368-2379
- [22] Nowak SJ, Corces VG. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation, *Trends Genet*, 2004, 20(4): 214-220

Advances in Research on Histone Phosphorylation

Shu-Liang Zhao, Jing-Yuan Fang*

(Shanghai Institute of Digestive Diseases, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200001, China)

Abstract Histone phosphorylation is one kind of histone modification and belongs to epigenetic modification. Phosphorylation in various histone subtypes can take part in genetic transcription, DNA repair, cell apoptosis, chromatin condensation and so on. It may regulate a series of life activities together with other histone modification such as acetylation.

Key words histone phosphorylation; histone modification; chromatin; cell cycle

Received: August 12, 2008 Accepted: December 12, 2008

*Corresponding author. Tel: 86-21-63200874, Fax: 86-21-63266027, E-mail: jingyuanfang@yahoo.com