

特约综述



我们主要运用分子细胞生物学和动物模型探索肥胖相关疾病(特别是二型糖尿病)的病理分子机制。目前主要在转录, 后转录以及蛋白质修饰水平上研究肝脏中的糖脂代谢机理及其在二型糖尿病发病机理中所扮演的角色。已展开对分子生物钟在肝糖异生基因调控中作用的研究。此外, 我们还将从事小分子筛选试图寻找潜在药物改善二型糖尿病人的糖脂代谢, 特别是增强病人的胰岛素敏感性。

http://www.nutrition.ac.cn/PI/PI_liuyi.asp

cAMP-CREB 信号转录通路新成员: CRTCs 的研究进展

陈亚琼 刘 涓*

(中国科学院营养与代谢重点实验室, 中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所, 上海 200031)

摘要 CRTCs (CREB Regulated Transcription Coactivator)是一个保守的真核蛋白质家族。作为 CREB (CRE response element-binding protein)转录调控的必须共激活因子, CRTCs 能与 CREB 结合并极大地增加后者的活性。同时作为 cAMP-CREB 信号转录通路的新成员, CRTCs 能在细胞核质间穿梭并整合多个通路的信号, 把细胞内外的信号直接传递到基因的转录活性。已经证实 CRTC 家族中的 CRTC2 在糖脂代谢调节及其相关疾病, 特别是 2 型糖尿病的发生发展起着重要的作用。由于靶点明确, 作用机制清楚, CRTC2 及上游特异的调控因子有希望成为新的 T2D 治疗靶点。本文综述近年来 CRTCs 的研究成果, 总结了 CRTC2 的发现、结构及分子机制。

关键词 CRTC 蛋白家族; cAMP-CREB 信号通路; 糖脂代谢; 肝糖异生

1 CRTCs 的发现

在过去三十年中, CREB (CRE response element-binding protein)作为一个至关重要的转录因子, 因为参与调节众多的生理活动, 而受到了广泛地研究。在 2003, 两个研究团队几乎同时分别利用基因组高通量筛选, 发现一种新的 CREB 转录辅助因子能够极大地增加 CREB 活性。作为首个被发现的 CREB 共激活因子^[1], 被命名为 TORC1 (Transducer of Regulated CREB)。因与哺乳动物雷帕霉素靶点 mTORC(mammalian target of rapamycin)名称类似, NCBI 重新命名为 CRTC (CREB Regulated Transcription coactivator)。后续的研究表明 CRTCs 是保证 CREB 活性所必须的, 并且 CRTCs 能在细胞核质间穿梭并整合多个通路的信号, 把细胞内外的信号直接传递到基因的转录活性, 因此 CRTCs 对多种信号通路的影响值得继续研究。

2 CRTC 家族

CRTCs 是一个保守的真核蛋白家族, 果蝇的同源基因产物 dCRTC 与小鼠 mCRTC1 有 20% 相似度。N 端螺旋-螺旋(氨基酸 1-56)是该家族的结构特征, 该部位与 CREB 的 ZIP 区域相互结合。序列和结构的保守与 CRTCs 家族在真核生物中的功能保守一致。

人类的 CRTC 家族有 3 个成员, CRTC1、2、3, 各亚型具有特征性的分布。CRTC1 主要在脑组织中表达, CRTC2 和 3 则分布在多种组织中, CRTC2 在肌肉组织中表达量最高而肝脏组织中较低, CRTC3 的高丰度表达部位是淋巴细胞和肺, 而在肌肉、肝、

中国科学院百人计划(No.2010OHTP08)和上海市浦江人才计划(No.10PJ1411200)资助项目

* 通讯作者。Tel: 021-54920976, E-mail: liuyi@sibs.ac.cn

胰、肠等消化系统中表达量低。3种亚型的N端氨基酸序列同源性为高于C端。其中CRTC2的功能亢进被证实与高血糖、胰岛素耐受性形成以及血脂调节紊乱有关,因而受到研究者的重视。

3 CRTC2的结构域

CRTC2由693个氨基酸组成。主要的结构域(图1)包括N端CBD(CREB binding domain, 1-56aa)形成高度保守的螺旋-螺旋结构,通过CBD区域CRTC2与CREB的ZIP区结合并聚合成4聚体。C端TAD(transcription active domain)具有转录活性并能与TAF结合,CRTC2通过拉近TAF4与CREB1的空间距离而增加CREB1的转录活性^[2]。出核信号区NES(nuclear export signal, 271-287)引导磷酸化的CRTC2出核,而入核信号区NLS(nuclear leading signaling)区域引导去磷酸化的CRTC2入核。

CRTC2的氨基酸序列特征是富含丝氨酸,具有5个丝氨酸连续区域(236~240)、8个丝氨酸连续区域(398~405)及丝氨酸富集区(336~408),多个丝氨酸的存在表明CRTC2可能受到多种激酶的作用。研究证明CRTC2蛋白质的多个氨基酸位点可以被修饰(表1)。目前研究证明NLS区中S171的磷酸化状态对CRTC2的转录活性及细胞定位有关键性作用^[2]。S171A突变导致CRTC2磷酸化作用缺失,与14-3-3蛋白质的结合能力显著下降,阻滞了CRTC2核质穿

梭,CRTC2被滞留在细胞核内^[2,3],使CRTC2与cAMP和钙离子信号通路的联系中断^[3],磷酸化缺失的CRTC2-S171A与CREB的相互结合不能被上游激酶以磷酸化的方式所抑制,造成CRE下游糖异生相关基因表达过度。而S368突变成A仅使CRTC2的信号转导活性降低。S70A, S393A突变对CRTC2的磷酸化没有影响, S70A突变后不能被氨基己糖转移酶(OGT,O-glycosyl transferase)识别,对CRTC2-S70糖基化修饰有干扰,使S70及S171的糖基化修饰障碍,进而降低了CRTC2的转录活性^[4]。K628是多种激酶的作用位点,K628能被p300/CBP所识别并泛素化,K628泛素化导致的CRTC2降解是下调CRTC2转录活性的一种方式,Sirt1和COP1抑制K628泛素化及CRTC2降解^[5]。也发现多个丝氨酸和苏氨酸能被磷酸化修饰,而人群中天然存在的突变如M147V, R379C是否对CRTC2功能有影响尚不清楚。

4 CRTC2调控的分子机制

鉴于CREB在许多生理现象中起到至关重要的作用,作为CREB转录必须的辅激活因子,CRTC自身的调节机制受到广泛关注和探索。其中以CRTC2在肝细胞中的调节分子机制被研究地最为清晰。在肝细胞中处于未激活状态的CRTC2持续地被激酶SIK磷酸化,并与14-3-3蛋白结合从而被隔离在细胞质中,不能与细胞核中CREB的相结合。当胰高血

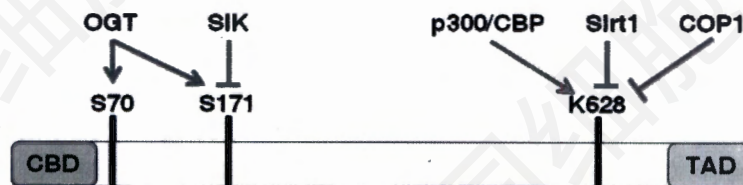


Fig.1 The structure of CRTC2

CBD represents CREB binding domain and TAD means transcription activation domain. The specific amino acid residues on CRTC2 differentially regulated by other proteins are indicated.

Table 1 The modifications of amino acid residues in CRTC2

<i>Homo sapiens</i> (Prot Q53ET0)	
N-acetylalanine	2
N6-acetyllysine	228
Phosphoserine	64, 70, 86, 90, 130, 136, 171, 306, 368, 393, 433, 456, 460, 489, 490, 492, 613, 624
Phosphothreonine	169, 192, 458, 497, 501
O-glycosylation	70, 171
Ubiquitination	628
Phosphotyrosine	130(mouse)#, 136 (mouse)#, 488

#Special in mouse, absent in human CRTC2.

糖素、Forskolin 或其他 cAMP 激活剂, 通过 cAMP-PKA 级联反应抑制 SIK 活性, 使得 CRTC2 去磷酸化并脱离 14-3-3 蛋白, 进而转移入细胞核被 p300 乙酰化并与 CREB 结合, 从而有力地上调 CREB 控制的下游基因表达^[3]。而相应的胰岛素一方面能够激活 SIK 激酶从而重新磷酸化抑制 CRTC2, 同时更通过 COP1 泛素化介导的蛋白降解来快速灭活 CRTC2, 从而有效抑制下游基因表达(图 2)^[5,6]。

5 CRTC2 参与的信号通路

除了 CREB 以外, 已经发现 CRTC2 还能与多种其他蛋白质结合(图 3), 如 SIK, p300/CBP, TRB3, COP1, PPP3CA/calcineurin α , SNF1LK2、14-3-3, YWHAB、YWHAG 和 RFWD2/COP1, ATF6a 等。这表明 CRTC2 能以蛋白质互作为基础整合多种通路的信号, 最后在基因转录水平上控制细胞对各种外来刺激的反应。下面对研究最为详尽, 作用最为重要的 cAMP-CREB 进行具体介绍。

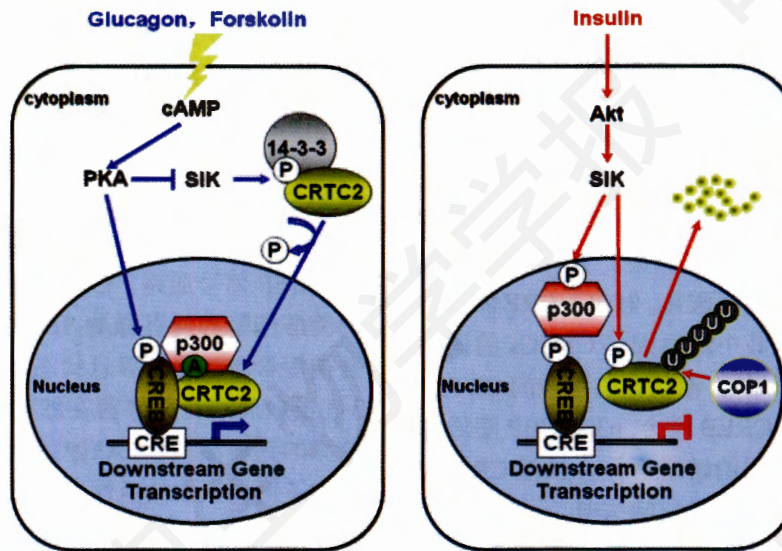
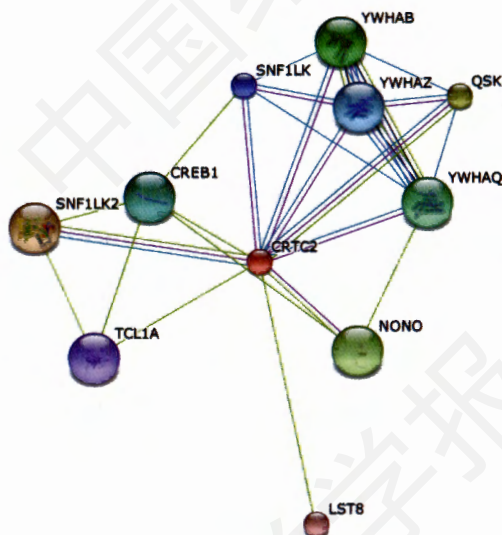


Fig.2 The regulatory mechanism of CRTC2 in hepatocytes

The diagram shows the activation of CRTC2 in hepatocytes by glucagon-cAMP pathway and inhibition by insulin-Akt pathway.



[SNF1LK2](#) Serine/threonine-protein kinase SNF1-like kinase 2 (SIK2)

[QSK](#) Serine/threonine-protein kinase QSK

[NONO](#) Non-POU domain-containing octamer-binding protein (NonO protein)

[YWHAB](#) 14-3-3 protein beta/alpha (Protein kinase C inhibitor protein 1) (KCIP-1)

[YWHAQ](#) 14-3-3 protein theta (14-3-3 protein tau) (14-3-3 protein T-cell) (HS1 protein)

[CREB1](#) cAMP response element-binding protein (CREB)

[YWHAZ](#) 14-3-3 protein zeta/delta (Protein kinase C inhibitor protein 1) (KCIP-1)

[SNF1LK](#) Serine/threonine-protein kinase SNF1-like kinase 1

[TCL1A](#) T-cell leukemia/lymphoma protein 1A (P14 TCL1 protein) (TCL1 oncogene)

[LST8](#) G protein beta subunit-like (GBL), mRNA; Unessential component of the TORC1 complex

Fig.3 The protein interaction network of CRTC2

Ten established CRTC2 binding protein and the interactions among them are summarized and connected.

6 CRTC2 在 cAMP-CREB 信号通路中的作用

与保守或变异的 CRE 元件的作用及 CREB 结合为 CRTC1 的发现提供了第一个线索, 同源的 CRTC2 也具有相似的作用^[2,7]。CREB 与 CBP 的互作及依赖于 CREB 上的 Ser133 磷酸化^[8], 进而使细胞对记忆、胁迫、激素及营养等信号做出应答, 但某些细胞类型中 CREB 表现出一种组成性转录活性, 其原因是 CRTC2 与 CREB 的 bZIP 区结合不依赖于 CREB(S133) 位的磷酸化, 该过程对 CREB 的 DNA 结合活性也没有影响^[2]。CREB 靶基因的不同类型启动子能被 CREB: CRTC2 差异性地调控, 因为不含 TATA 的 CRE 启动子对 cAMP 刺激无应答^[7]。

多种激素和生长因子通过促进细胞内 cAMP 积累诱导 CREB 磷酸化从而上调 CRE 下游基因的转录, 同时也促进 CREB 与组氨酸乙酰化酶同系物 p300 和 CBP 的结合。胁迫信号, 如感染、紫外、温度等同样触发一定量的 CREB 磷酸化, 但对于 CRE 依赖性的转录活性影响很小, 其中的原因与 CRTC2 的调控机制有关。当 cAMP 积累时, 潜伏在胞质的 CRTC2 被 SIK1 激活后入核与 CREB 结合, p300/CBP 随后与之结合, 共同调节靶基因的转录活性。虽然 CRTC2 对胁迫信号没有反应, 但是当它缺失时, p-CREB 不能诱导依赖于 CRE 的转录。在缺失 CBP 的条件下, 过表达 CREB 的功能获得性突变增加了与 CBP 的亲合性, 恢复了 CRE 调控的胁迫信号诱导转录活性, 证实了 CRTC2 对 p300/CBP 占据启动子的重要性。这些结果表明 CRTC2 是一个长期寻找的同激活因子, 差异性地介导了 CREB 对 cAMP 及胁迫信号的选择性^[9]。

7 CRTC1、2 在糖、脂代谢调节中的作用

7.1 糖代谢

近 7 年的研究表明 CRTC2 对空腹饥饿糖脂代谢起着重要的调控作用。肝脏糖异生加强是机体对空腹饥饿的适应, 而糖异生失控造成葡萄糖输出过量是糖尿病形成早期症状之一。正常生理条件下, 胰岛素和胰高血糖素相互拮抗, 在多个水平上调控葡萄糖的产生和消耗, 维持血糖浓度在正常范围内波动。作为升糖激素之一, 胰高血糖素通过激活 cAMP-PKA 和 PKC-钙调蛋白信号通路, 激活 CREB 的转录活性, 诱导糖异生相关酶编码基因的表达, 如 PEPCK、G6Pase、PGC-1 α , 增强肝糖异生。但是空腹饥饿

和其它胁迫信号是如何选择性的利用 PKA, PKC 等通路的问题直到 CRTC2 的功能被解析后才有比较清晰的答案。

CRTC2 是空腹饥饿血糖代谢的一个关键调节子。空腹饥饿信号, 如胰高血糖素、肾上腺素等结合相应受体, 激活 cAMP-PKA 信号通路。激活的 PKA 抑制 SIK1 磷酸酶活性, 从而导致处于静息态 CRTC2 上磷酸化的 S171 脱去磷酸基团允许 CRTC2 入核。激活后 CRTC2 的 N 端 CBD 与 CREB 的 ZIP 区结合, 其 C 端的 TAD 区与其他转录因子结合, 促进 CRE 上形成的转录复合体活性的极大提高, 依赖于 CRE 调控的一系列糖异生基因表达增加, 增强肝糖合成, 提高血糖浓度。这是 CRTC2 在经典的 cAMP-CREB 信号通路中的作用。

营养状况和激素两种信号分别通过磷酸酯酶及激酶通路共同调节 CRTC2 的转录功能, 精确控制 CRTC2 的活性。CRTC2 被发现能协同调节钙信号及 cAMP 信号通路。CRTC2 能分别与依赖钙调蛋白的磷酸酯酶和丝苏激酶 SIK2(AMPK 成员) 相互结合并被后者磷酸化。静息状态下, 磷酸化 CRTC2 与 14-3-3 蛋白质结合并停留在细胞质中, 葡萄糖和肠泌素诱导的钙流激活和 cAMP 信号增强, 钙离子浓度升高增加了钙调蛋白的活性, cAMP 的积累则抑制了 SIK2 的激酶活性, 使 CRTC2 去磷酸化, 打破 CRTC2:14-3-3 复合体形成, 抑制了核输出, 导致 CRTC2 停留在细胞核内, 使 CRTC2 的转录活性增加。因此营养状况和激素的信号通路在 CRTC2 得到整合^[3,10]。AMPK 激活的信号通过促进 CRTC2 磷酸化, 拮抗 CRTC2 在核内的聚集, 削弱了糖异生^[10]。由于 T2D 病人的特征为失控的糖异生造成持续偏高的空腹饥饿高血糖, 因此增强 CRTC2 磷酸化的化合物可能成为血糖调节剂。

CRTC2 在空腹饥饿肝糖异生和胰岛素信号通路中担任双重角色。空腹饥饿条件下, CREB 的共激活因子 CRTC2 通过诱导糖异生酶的表达而增加血糖输出。胰高血糖素受体被升高的胰高血糖素激活以后, cAMP 升高, 激活 CREB 转录活性, 并且使 CRTC2 去磷酸化入核, 发挥增强 CREB: CRTC2 转录活性的作用, 使糖异生相关酶编码基因的表达增强, 发挥升血糖作用。而相应的胰岛素一方面能够激活 SIK 激酶从而重新磷酸化抑制 CRTC2, 同时更通过 COP1 泛素化介导的蛋白降解来快速灭活 CRTC2。与此同时, CREB:CRTC2 复合体通过诱导胰岛素受体 IRS2 基因

的表达, 增强肝脏的胰岛素信号转导。IRS2 的表达水平与血糖稳定有关键的作用, IRS2 表达受损导致胰岛素信号通路障碍使机体对血糖耐受, 另一方面 IRS2 的过表达则降低糖异生和空腹饥饿血糖水平。因此空腹饥饿条件下, CREB: CRTC2 通过不同的通路协同调控肝糖输出^[11]。

CRTC2 功能受到糖尿病一线治疗药物 metformin 的调控。LKB 是 AMPK 的上游激酶, LKB1 的缺失造成 AMPK 功能丧失, 对糖异生及脂肪生成的抑制作用降低导致高血糖。Metformin 降血糖的靶点之一是正常的 LKB1, 在 LKB/AMPK 缺失的条件下 metformin 降糖作用消失, 由于靶点缺失 metformin 无法通过 LKB 发挥作用, 同时 LKB1 的缺少导致 CRTC2 激活, PGC-1 α 的表达增强, 从而驱动糖异生。因此 CRTC2 在 LKB 调控糖异生过程中是 LKB/AMPK 信号通路的关键靶点之一^[12]。

CRTC2 通过调控 PGC-1 α 的表达调节呼吸作用及 PGC-1 α 下游的信号通路。PGC-1 α 是线粒体形成中的一个重要调控因子, 在能量代谢中担负重要的作用。为了鉴定出 PGC-1 α 编码基因的上游调控因子, 对人源的 10 000 个全长 cDNA 进行了筛选, 检测指标为编码蛋白产物结合 PGC-1 α 启动子的能力。该方法发现了多个 PGC-1 α 基因的转录调控因子, 转录活性最高的是 CREB 的共激活因子, CRTC1、2、3。原代肌肉细胞中过表达 CRTCs 诱导内源性 PGC-1 α 的 mRNA 含量增加, 增强了由 PGC-1 α 调控的线粒体呼吸链和 TCA 代谢功能中的靶基因转录^[13]。

SIK1 是 AMPK 激酶家族 II 的成员, 能增强骨骼肌细胞的存活^[14]。肌细胞增强因子 MEF2 的转录活性在运动时增强, 诱导肌肉特异基因的表达。胞内钙流增加, 通过磷酸化的方式使 HDACII 失活。为了研究 CREB 在骨骼肌中的作用, 研究者发现过表达显性负性 CREB 的转基因老鼠表现出营养不良伴随 MEF2 活性降低。表达显性负性 CREB 的肌细胞中 HDACII 的磷酸化降低, 是由于抑制了 SIK1 的积累。通过病毒载体表达 Snf1k 或者使用小分子化合物抑制 HDAC 二型的活性则加重了 M-ACREB 的营养不良。因此指出了 SIK1-HDAC 信号通路在调控肌肉功能中的作用。

胰岛素降低肝糖异生必需抑制 CRTC2 的转录活性^[6]。该研究表明进食后的小鼠体内分泌的胰岛素抑制糖异生是通过促进 CRTC2 磷酸化及依赖于泛素的 CRTC2 降解。胰岛素通过激活 SIK2 干扰了 CRTC2

的活性, 该过程包括了 Akt 介导的 SIK2-S358 磷酸化, SIK 使 CRTC2-S171 磷酸化, 进食时磷酸化的 CRTC2 与 COP1 结合, 促进 CRTC2 在 K628 被泛素化, 增强了 26S 蛋白酶体介导的 CRTC2 降解^[6]。

Puigserver 等^[15]的报道揭示了 GCN5 介导的乙酰化和 SIRT1 介导的去乙酰化能够调节 PGC-1 α 调控的糖异生活性。而在对 CRTC2 在空腹饥饿的不同时期中的活性研究中发现 p300 和 SIRT1 介导的乙酰化/去乙酰化同样对 CRTC2 起着至关重要的作用。空腹饥饿早期, 肌肉细胞对胰高血糖素反应为增加骨骼肌蛋白质水解释放出游离氨基酸用于肝糖异生。当肝脏产生的酮体代偿性地为消耗葡萄糖的组织提供能量时, 消耗蛋白质的空腹饥饿后期肝糖输出降低。在分子水平上, 组氨酸乙酰化酶 p300 和营养感受器去乙酰化酶 SIRT1 共同组成空腹饥饿诱导的转录开关^[5], 通过先后诱导 CRTC2 和 FOXO1 活性维持小鼠的血糖的平衡。在空腹饥饿早期, 胰高血糖素刺激后, p300 不仅协同 CRTC2 促进糖异生基因表达, 同时也抑制 FOXO1, 从而保证只有 CREB/CRTC2 介导的荷尔蒙应激反应上调肝糖异生基因表达, 快速有效地补充血糖消耗。随着空腹饥饿地持续, SIK 激酶以及 SIRT1 蛋白表达水平都上调, 一方面 SIK 激酶能够通过磷酸化 Ser89 抑制 p300, 使得 CRTC2 的 K628 被 SIRT1 去乙酰化, 从而允许 CRTC2 被 COP1 泛素化进而造成 CRTC2 蛋白降解, 另一方面 p300 的抑制以及 SIRT1 的上调能够同时激活 FOXO1 介导的压力应激反应(stress response)调控的肝糖异生基因表达, 从而低效但持续地提供血糖以保持体内最低的能量消耗^[5]。

CRTC2 功能与胰岛素耐受性形成有一定的关系。定向抑制 CRTC2 的作用会增加胰岛素的敏感性。空腹饥饿时升高的胰高血糖素激活 CREB/CRTC2 转录活性, 诱导肝糖异生的作用, 保持空腹饥饿时血糖浓度稳定。肥胖病人中 CRTC2 亢进, 但是 CRTC2 在多大程度上加剧了胰岛素抗性还不清楚。研究发现敲除 CRTC2 的小鼠肝糖异生被削弱, 表现出空腹饥饿血糖浓度降低。已经证实 CRTC2 通过与 CREB 的 N 端互作增加胰高血糖素刺激下 CREB 的转录活性。小鼠 CRTC2(-/-) 中删去 CRTC2 的 CREB 结合区后能降低血糖并改善高脂诱导肥胖症小鼠对胰岛素的敏感性。而能干扰 CREB/CRTC2 互作的小分子化合物有可能成为 T2D 治疗的新方法^[16]。

持续高血糖会使糖尿病人的血糖控制更加钝

化。研究发现高血糖引起 CRTC2 糖基化,糖基化的 CRTC2 上调肝糖异生途径。持续偏高的血糖浓度会激活 O-糖基转移酶(OGT)促进 CRTC2 的 Ser70/171 糖基化形成 O-糖蛋白。过表达去糖基化酶 OGNAS 降低 O-糖基化 CRTC2 的量,进而下调了糖对糖异生的抑制作用,表明氨基己糖合成途径(HBP)对糖耐受性的形成有重要意义^[4]。

葡萄糖通过磷酸化 CRTC2 控制胰岛细胞中的 CREB 转录活性,进而影响胰岛细胞的功能。胰岛细胞中 CREB 转录活性低,静息态的 CRTC2 通过与 14-3-3 的互作被隔离在胞质,当受到刺激时,CRTC2 去磷酸化后入核,结合占据启动子的 CREB 激活 CREB 转录。但是胰岛细胞中 cAMP 信号刺激的 CRTC2-S171 的磷酸化并不足以驱动 CRTC2 入核和转录活性,研究者在胰岛 β 细胞中鉴定出 CRTC2-S275 位点对于传递葡萄糖和 cAMP-CREB 信号也非常重要。CRTC2 的 S275 作为 14-3-3 的结合位点在低血糖时被磷酸化,而葡萄糖流入使依赖钙调蛋白的磷酸酯酶靶向去磷酸化 CRTC2-S275,降低糖异生。在 180 种人类蛋白激酶中,筛选出 MAPK2 是 CRTC2-S275 的激酶,能抑制胰岛 β 细胞中 CREB/CRTC2 的转录活性。因此,该研究说明 cAMP 和葡萄糖是协同促进胰岛细胞存活的关键因子。

CRTC2 协同调节胰岛 β 细胞钙信号及 cAMP 信号通路。静息状态下,磷酸化 CRTC2 与 14-3-3 蛋白质结合并停滞在细胞质中,葡萄糖和肠泌素诱导的钙流及 cAMP 信号增强,钙流增加了钙调蛋白的活性,CRTC2 与依赖钙调蛋白的磷酸酯酶和丝苏激酶 SIK2 相互结合并被后者去磷酸化,而 cAMP 浓度升高抑制 SIK2 的激酶活性,使 CRTC2 去磷酸化,打破 CRTC2:14-3-3 复合物,导致 CRTC2 停留在细胞核内。磷酸酯酶及激酶机制联系了营养条件和激素的两个信号通路^[3]。

CRTC2 敲除小鼠中证实了 CRTC2 对肝脏糖代谢的调控作用。CRTC2 敲除小鼠的肝细胞对胰高血糖反应降低,结合在糖异生基因启动子上的 CREB 量降低,CREB 靶向的 PEPCK, G6pASe, PGC-1 α 表达降低,但并未观察到低血糖。该遗传证据证实了 CRTC2 在空腹饥饿时的转录活性,研究者认为 CRTC2 主要贡献是调控肝脏对空腹饥饿刺激的转录反应,但并非维持血糖平衡必需的^[17]。

7.2 脂代谢

高血糖往往与脂类代谢紊乱相关。T2D 病人体

内 VLDL 浓度升高,加剧了患冠心病的风险、目前发现 Foxa2 刺激 VLDL 的产生与 PGC-1 β 相关,而胰岛素通过抑制 Foxa2 活性减弱这个过程^[18]。因此胰岛素不耐受与脂类代谢的紊乱必然有各个层次的联系。CRTC2 及依赖钙调蛋白的磷酸酯酶参与 FSH 和 TGF-B1 上调类固醇生成途径^[19]。在形成 T2D 的早期,脂肪组织的增加触发了代谢及炎症干扰外周组织中胰岛素的活性,最终导致 B 细胞的死亡和显性糖尿病。脂肪细胞 CREB 提供了 T2D 发病的早期信号。肥胖症患者脂肪细胞中 CREB 加剧了胰岛素抗性^[20]。肥胖条件下,脂肪细胞中激活的 CREB 量增加,同时它触发转录抑制子 ATF3 的表达,因此下调了脂肪激素 adiponectin 以及胰岛素敏感性的葡萄糖转运蛋白 GLUT4。转基因小鼠中表达同义抑制性突变体 A-CREB 增进了整体对胰岛素的敏感性,并避免了脂肪肝和脂肪组织炎症形成^[20]。在 CREB 发挥作用的转录复合体中,CRTC2 可能占有重要的作用。

脂肪组织产生的激素-瘦素-能通过作用下丘脑瘦素受体 LEPRs,进而通过信号通路激活 STAT3。尽管打破 LEPR-STAT3 信号通路能促进小鼠肥胖,但是 LEPR 的其他功能比如不育暗示着还牵涉到其他的调控因子。研究者发现 CREB-CRTC1 对于能量平衡和不育是必需的,CRTC1^{-/-} 小鼠的特征是活动性少、肥胖和不育的。leptin 缺失的 OB 肥胖小鼠下丘脑中 CRTC1 磷酸化后失活,核内去磷酸化的 CRTC1 增加了。CRTC1 被激活后刺激 Cartpt 和 KISS1 基因的表达,表达下丘脑神经多肽,介导 leptin 对饱食和生殖的作用。在下丘脑细胞中过表达 CRTC1 折增加 CARTPT 和 Kiss1 基因的表达。但是 CRTC1 的缺失降低这个反应。实际上,在过表达 LEPR 的细胞中 leptin 增强了 Cartpt 和 KISS 基因启动子 CRTC1 的作用,这种作用能被 A-CREB 打破。Leptin 增强下丘脑 CRTC1 结合在 CARTPT 和 KISS1 启动子上,结果表明 CREB1-CRTC1 通路执行着激素和营养信号对能量平衡和生育的中心调节作用^[21]。

最近研究发现棕色脂肪中胰岛素刺激 PGC-1 α 和 UCP-1 基因表达受到 SIK/CRTC2 信号通路调控^[22]。在脂肪细胞 T37i,以及 SIK2-S587A 磷酸化缺失的肥胖敏感型小鼠体内进行了检测发现 SIK2-S587 磷酸化与 CRTC2 磷酸化正相关与 CRTC2 活性负相关。脂肪细胞 T37i 中胰岛素抑制 PGC-1 α 和 UCP-1 转录的作用能被过表达 SIK2-S587A 突变和 A-CREB 所改善。胰岛素促进 SIK2 磷酸化 S587,伴随 CRTC2 磷

酸化的降低。在高脂诱导的肥胖鼠棕色脂肪组织中 SIK2-S587 的磷酸化降低。由于 SIK2-S587 量与 CRTC2 磷酸化负相关, 用脂肪酸结合蛋白 2 的启动子使 SIK2-S587A 组织特异性地表达在棕色脂肪中, 相同组织中 CRTC2 磷酸化水平被升高。雄性转基因小鼠出现高脂诱导肥胖症, 其棕色脂肪组织中 PGC-1 α 和 UCP-1 的 mRNA 含量降低, 表明在 BAT 组织中, 胰岛素调节 PGC-1 α 和 UCP-1 基因表达过程中 SIK2/ CRTC2 通路具有重要作用^[22]。

8 CRTC2 功能紊乱与其他疾病

除了调控糖脂代谢, CRTC2 的功能紊乱被发现与一些疾病的产生、复发等有关。潜伏的疱疹病毒 (Epstein-Barr virus) 激活依赖于病毒 BZLF1 蛋白质的表达, 该过程需要 CRTC2 参与。CRTC2 通过结合在 ZII 和 ZIII 顺式元件上增强 ZP 活性及 BZLF1 的表达, CRTC2 与 BZLF1 互作后结合在 ZP 上, 激活启动子。该作用被钙调蛋白依赖性的磷酸酯酶所增强。Murata^[23] 提出潜伏期疱疹病毒利用钙调蛋白依赖性的磷酸酯酶 CRTC2 信号通路促进 CRTC 和 BZLF1 的结合, 表达 BZLF1 蛋白质从而被激活。

CRTCs 与 1 型人 T 细胞白血病病毒 Tax 激活 LTR 执行转录活性有关。Tax 激活 LTR 的机制已经清楚, 但是有哪些共激活因子参与这个过程还不清楚。研究者发现 CRTCs 家族的 3 个成员都是 Tax 对 LTR 转录活性的共激活因子^[24]。Tax 与 CRTC1、2、3 相互结合, CRTCs 缺失则抑制 Tax 活性。CRTC 的共激活活性能被 p300 进一步增强, p300 的共激活作用是完整 Tax 活性必需的, 并且独立于 CRTCs。CRTCs 和 p300 家族成员的共激活因子对于 TAX 诱导的 HTLV-1 的最佳转录活性是必需的^[24]。并且 CRTC2 具有体内特异性控制 HTLV-1 转录的作用^[25]。CRTC2 的表达降低被认为与成人 T 细胞性白血病病毒体内潜伏有关。该研究提供了新的体内抑制 HTLV-1 活性的可逆转的机制, 该机制并不包括 DNA 甲基化或组蛋白乙酰化。人们发现 HTLV-1 在淋巴细胞中的转录活性由 CRTC2 控制^[25], 研究提供了新的体内抑制 HTLV-1 活性的可逆转的机制, 这一机制不包括 DNA 甲基化或组蛋白乙酰化。并且 EL4-Gax 细胞中, CRTC2 的表达降低被认为与成人 T 细胞性白血病病毒体内潜伏有关^[25]。

在粘膜肿瘤细胞系中存在因染色体易位造成的 CRTC 的 N 端与 MAML2 (Notch coactivator Mastermind)

蛋白质融合表达, 在肿瘤细胞系中也表现出诱导 CREB 靶基因表达^[2]。CRTC3-MAML2 融合表达转录本的临床检测值可以指导粘膜表皮癌的特征。该融合转录本的存在与表皮癌的临床病例特征相吻合^[26]。

人巨细胞病毒 (HCMV) 的潜伏后激活机制尚不清楚。作者发现 MIE 的表达启动病毒复活, 而 MIE 基因表达被血管活性肠肽 (VIP) 激活, 这个过程由 CRE 启动。即 PKA-CREB-CRTC2 信号通路被 VIP 启动。即使没有 VIP 的刺激, CRTC2-S171A 表现出入核增加, 以及诱导 MIE 基因的表达。所以, 作者推测 HCMV 感染的静息期 NT2 细胞中, VIP 刺激启动 PKA-CREB-CRTC2 信号通路, 激活 HCMV 的 CRE 依赖性的 MIE 基因表达。因此神经激素刺激下的信号通路可能使活体内 HCMV 病毒复活^[27]。

人 T 细胞白血病病毒 (HTLV-1) 感染会造成恶性淋巴瘤。HTLV-1 的 tax 蛋白质与磷酸化的 CREB, CRTC2 和 p300 共同调节 CRE 依赖性的周期素 D1 转录。HTLV-1 病毒编码的 Tax 执行病毒复制功能, CyclinD1 是重要的周期控制蛋白, 在肿瘤细胞中表达显著增加。研究者发现了 Tax 激活 CyclinD1 的机制。Tax 结合于 CyclinD1 的启动子近端 CRE 元件, p-CREB 同时存在, Tax-pCREB 蛋白复合体招募 p300 结合于启动子。在这个过程中 CRTC2 能与 Tax 结合并促进 p300 聚集与 CyclinD1 启动子。Tax 和 CRTC2 共同刺激 CyclinD1 活体内表达, 证实了结合子相互作用的功能表现。因此 Tax 诱导恶性 T 细胞中 CyclinD1 积累, 缩短 G₁ 期, 促进病毒的复制, 增加选择性^[28]。

因此也有人提出 CRTC 也可能是原癌基因产物。因为在多个恶性肿瘤中 CRTC 基因表达可能失控^[29]。肺癌 LKB1 细胞中 CRTC1 活性增强。肺癌细胞中 LKB1 是突变失活的靶点, 最近发现小鼠 LKB1 调控肝 CRTC2/CREB 转录活性。尽管 CRTC1 在脑中丰度高, 但是研究发现胸腺癌细胞中 CRTC1 蛋白水平升高。并且外周 LKB1 蛋白减少与内源的 CRTC1 磷酸化不足有关, 出现 CRTC1 入核增加, 上调 CRTC 靶基因 NR4A2 表达。作者提出失调的 CRTC 可能是一种癌基因, 代表了 LKB1 致癌轴中一个新成员。

9 以 CRTC2 功能为靶点的降糖药物发现

CRTC2 从发现至今的近十年积累的数据表明 CRTC2 是一个重要的转录共激活因子, 能与 CREB, SIK1, COPI1, Tax 等多种蛋白质相互作用, 在基因转录水平上调控肝糖异生、细胞周期、转化等过程中

蛋白质的表达。CRTC2整合了糖代谢的多种因子,包括cAMP激动剂、胰岛素、AMPK,所以CRTC2是一个新的血糖调节剂靶点。脂肪组织分泌的己二腈(adiponectin)及临床上常用的一线降糖药metformin和噻唑烷二酮类(thiazolidinedione)的降糖机制中包括了CRTC2,这些分子通过干扰AMPK的激酶活性间接抑制CRTC2活性进而降低肝糖异生。由于靶点明确,作用机制清楚,CRTC2及上游特异的调控因子有希望成为新的T2D治疗靶点。

肝糖异生持续偏高造成的慢性高血糖及肝糖输出高是T2D形成的一个重要的特征。CRTC2调控肝糖异生的功能被初步应用在降血糖新型药物开发中,研究者发现新型的肝脏特异表达CRTC2-siRNA能纠正T2D模型小鼠的高血糖^[30],有希望开发出小分子核酸药物。有效的活体CRTC2敲除方法可能为治疗T2D提供一种新的方法。

CRTC2转录活性功能的部分抑制剂有可能改善肥胖症或糖尿病人功能亢进的肝糖异生,改善高血糖。我国的物种资源丰富,急待从天然化合物中寻找干扰CRTC2蛋白质相互作用的活性化合物,为开发新型降糖药提供先导化合物。

参考文献(References)

- 1 Iourgenko V, Zhang W, Mickanin C, Daly I, Jiang C, Hexham JM, *et al.* Identification of a family of cAMP response element-binding protein coactivators by genome-scale functional analysis in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(21): 12147-52.
- 2 Conkright MD, Canettieri G, Sreaton R, Guzman E, Miraglia L, Hogenesch JB, *et al.* TORCs: transducers of regulated CREB activity. *Mol Cell*, 2003; 12(2): 413-23.
- 3 Sreaton RA, Conkright MD, Katoh Y, Best JL, Canettieri G, Jeffries S, *et al.* The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector. *Cell* 2004; 119(1): 61-74.
- 4 Dentin R, Hedrick S, Xie J, Yates JR 3rd, Montminy M. Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science* 2008; 319(5868): 1402-5.
- 5 Liu Y, Dentin R, Chen D, Hedrick S, Ravnskjaer K, Schenk S, *et al.* A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature (London)* 2008; 456(7219): 269-74.
- 6 Dentin R, Liu Y, Koo SH, Hedrick S, Vargas T, Heredia J, *et al.* Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2. *Nature* 2007; 449(7160): 366-9.
- 7 Conkright MD, Guzman E, Flechner L, Su AI, Hogenesch JB, Montminy M. Genome-wide analysis of CREB target genes reveals a core promoter requirement for cAMP responsiveness. *Mol Cell* 2003; 11(4): 1101-8.
- 8 Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(8): 599-609.
- 9 Ravnskjaer K, Kester H, Liu Y, Zhang X, Lee D, Yates JR 3rd, *et al.* Cooperative interactions between CBP and TORC2 confer selectivity to CREB target gene expression. *EMBO J* 2007; 26(12): 2880-9.
- 10 Koo SH, Flechner L, Qi L, Zhang X, Sreaton RA, Jeffries S, *et al.* The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* 2005; 437(7062): 1109-11.
- 11 Canettieri G, Koo SH, Berdeaux R, Heredia J, Hedrick S, Zhang X, *et al.* Dual role of the coactivator TORC2 in modulating hepatic glucose output and insulin signaling. *Cell Metab* 2005; 2(5): 331-8.
- 12 Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, *et al.* The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 2005; 310(5754): 1642-6.
- 13 Wu Z, Huang X, Feng Y, Handschin C, Gullicksen PS, Bare O, *et al.* Transducer of regulated CREB-binding proteins (TORCs) induce PGC-1 α transcription and mitochondrial biogenesis in muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(39): 14379-84.
- 14 Berdeaux R, Goebel N, Banaszynski L, Takemori H, Wandless T, Shelton GD, *et al.* SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes. *Nat Med* 2007; 13(5): 597-3.
- 15 Lerin C, Rodgers JT, Kalume DE, Kim SH, Pandey A, Puigserver P. GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1 α . *Cell Metab* 2006; 3(6): 429-38.
- 16 Wang Y, Inoue H, Ravnskjaer K, Viste K, Miller N, Liu Y, *et al.* Targeted disruption of the CREB coactivator CRTC2 increases insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(7): 3087-92.
- 17 Le Lay J, Tuteja G, White P, Dhir R, Ahima R, Kaestner KH. CRTC2 (TORC2) contributes to the transcriptional response to fasting in the liver but is not required for the maintenance of glucose homeostasis. *Cell Metab* 2009; 10(1): 55-62.
- 18 Koo SH, Montminy M. Fatty acids and insulin resistance: a perfect storm. *Mol Cell* 2006; 21(4): 449-50.
- 19 Fang SH, Lee MT, Ke FC, Hwang JJ. Follicle-stimulating hormone (FSH) and transforming growth factor beta 1 (TGF-Beta 1) upregulate steroidogenesis may involve activation of calcineurin and coactivator CRTC2/TORC2. *Biol Reprod* 2009; (Suppl. S): 134-5.
- 20 Qi L, Saberi M, Zmuda E, Wang Y, Altarejos J, Zhang X, *et al.* Adipocyte CREB promotes insulin resistance in obesity. *Cell Metab* 2009; 9(3): 277-86.
- 21 Altarejos JY, Goebel N, Conkright MD, Inoue H, Xie J, Arias CM, *et al.* The CREB1 coactivator CRTC1 is required for energy balance and fertility. *Nat Med* 2008; 14(10): 1112-7.
- 22 Muraoka M, Fukushima A, Viengchareun S, Lombes M, Kishi F, Miyauchi A, *et al.* Involvement of SIK2/TORC2 signaling cascade in the regulation of insulin-induced PGC-1 α and UCP-1 gene expression in brown adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296(6): E1430-9.
- 23 Murata T, Sato Y, Nakayama S, Kudoh A, Iwahori S, Isomura

- H, *et al.* TORC2, a coactivator of cAMP-response element-binding protein, promotes Epstein-Barr virus reactivation from latency through interaction with viral BZLF1 protein. *J Biol Chem* 2009; 284(12): 8033-41.
- 24 Siu YT, Chin KT, Siu KL, Yee Wai Choy E, Jeang K T, Jin DY. TORC1 and TORC2 coactivators are required for tax activation of the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeats. *J Virol* 2006; 80(14): 7052-9.
- 25 Jiang S, Inada T, Tanaka M, Furuta RA, Shingu KFujisawa J. Involvement of TORC2, a CREB co-activator, in the *in vivo*-specific transcriptional control of HTLV-1. *Retrovirology*, 2009; 6: 73.
- 26 Nakayama T, Miyabe S, Okabe M, Sakuma H, Ijichi K, Hasegawa Y, *et al.* Clinicopathological significance of the CRTC3-MAML2 fusion transcript in mucoepidermoid carcinoma. *Mod Pathol* 2009; 22(12): 1575-81.
- 27 Yuan J, Liu X, Wu AW, McGonagill PW, Keller MJ, Galle CS, *et al.* Breaking human cytomegalovirus major immediate-early gene silence by vasoactive intestinal peptide stimulation of the protein kinase A-CREB-TORC2 signaling cascade in human pluripotent embryonal Ntera2 cells. *J Virol* 2009; 83(13): 6391-403.
- 28 Kim YM, Geiger TR, Egan DI, Sharma N, Nyborg JK. The HTLV-1 tax protein cooperates with phosphorylated CREB, TORC2 and p300 to activate CRE-dependent cyclin D1 transcription. *Oncogene* 2010. 29(14): 2142-52.
- 29 Komiya T, Coxon A, Park Y, Chen WD, Zajac-Kaye M, Meltzer P, *et al.* Enhanced activity of the CREB co-activator Crtc1 in LKB1 null lung cancer. *Oncogene* 2010; 29(11): 1672-80.
- 30 Saberi M, Bjelica D, Schenk S, Imamura T, Bandyopadhyay G, Li P, *et al.* Novel liver-specific TORC2 siRNA corrects hyperglycemia in rodent models of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; (297): 1137-46.

CRTCs: an Essential Coactivator Family of CREB Regulated Transcription

Ya-Qiong Chen, Yi Liu*

(Key Laboratory of Nutrition and Metabolism, Institute for Nutritional Sciences, Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Since its first description in 1987, CREB (CRE response element-binding protein) has been widely studied as a critical transcription factor to regulate many important genes with various functions. A recently identified pivotal CREB coactivator family, CRTCs is able to dramatically enhance CREB activity and involved in multiple CREB regulated physiological events. Among them, CRTC2 is the one best understood and its path/physiological function and regulatory mechanism have been well established in the last decade. Here, we will introduce the molecular structure and regulatory mechanism of CRTC family and then focus on the role of CRTC2 in obesity related diseases, especially type 2 diabetes.

Key words CRTCs; cAMP-CREB pathway; glucose metabolism; gluconeogenesis

This work was supported by the Chinese Academy of Sciences Hundred Project(No.2010OHTP08) and Shanghai Pujiang Program (No.10PJ1411200)

*Corresponding author. Tel: 021-54920976, E-mail: liuyi@sibs.ac.cn