

- [28] Bradock, M. et al., 1990, *Cell*, **62**: 1123—1133.
- [29] Bouvet, P. et al., 1994, *Cell*, **77**: 931—941.
- [30] Bradock, M. et al., 1994, *Nucleic Acids Res.*, **22**: 5255—5264.
- [31] Yurkova, M. S. et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, **272**: 10870—10876.
- [32] Gunkel, N. et al., 1995, *Nucleic Acids Res.*, **23**: 405—412.
- [33] Davydova, E. K. et al., 1997, *Nucleic Acids Res.*, **25**: 2911—2916.
- [34] Ise, T. et al., 1999, *Cancer Res.*, **59**: 342—346.

热休克蛋白和蛋白水解酶与生物的应激反应

伍 雁 徐存拴

(河南师范大学生命科学学院 新乡 453002)

1962年,法国学者 Ritossa 在研究果蝇多线染色体时发现,果蝇一旦经热或化学处理,就会诱导其多线染色体产生一些特异的染色体膨大,即激活一些基因的表达^[1]。这些基因的表达产物热休克蛋白(HSP)已被纯化^[2],基因也逐渐被分离^[3]。以后进一步研究发现,几乎所有生物,当受到各种应激因子(生物、生理、物理、化学等)刺激时,其细胞和生物体会合成一套保守的多肽即热休克蛋白,从而保护生物免受应激胁迫的伤害,这一系列的代谢变化,就是生物的热休克反应(HSR),也称为生物的应激反应(stress response),它是生物在长期的进化过程中保留下来的自我保护机制^[3]。

热休克蛋白由一些最保守的蛋白家族构成。热休克蛋白家族包括构成性和诱导性成员。构成性热休克蛋白(HSC)含量比较丰富,存在于正常细胞中,它们主要在细胞的正常发育、分化和代谢中发挥作用^[4,5];诱导性热休克蛋白(HSP)在生物的应激反应中合成,主要在保护生物免受应激胁迫的伤害中发挥作用^[6,7]。

通常,诱导表达热休克蛋白(HSP)的信号是“异常”蛋白质(即变性蛋白质)的出现^[8]。在体内能充分诱导热休克蛋白合成的处理,在体外也能使蛋白质损伤或变性。因此,象高浓度乙醇,重金属离子,氨基酸类似物,嘌呤霉素等这些可导致蛋白质变性的物质,都可诱导一个热休克样的反应^[9,10]。另外,外来蛋白和/或变性

蛋白在胞内的累积也可诱导很多类型的细胞合成热休克蛋白^[8,11]。

现在研究发现,HSPs至少可通过两个最一般的途径,去帮助细胞处理胁迫造成的多肽链的损伤。第一,HSPs能促进变性蛋白质的降解。这些受损蛋白的快速降解可以减少其与功能蛋白发生有害联系,可以防止不溶蛋白的有害积累,并可以释放无功能多肽中的氨基酸从而合成其他新的功能蛋白。实际上,一些HSPs本身固有蛋白水解活性,而一些HSPs在蛋白水解中起辅助作用^[9]。第二,HSPs能使胁迫损伤的变性蛋白质复性。已知一些HSPs是“伴侣分子”(chaperone),与变性蛋白质结合,阻止变性蛋白质的聚合并促进其正确的重新折叠。实际上,很多热休克蛋白的分子伴侣功能与它们的蛋白水解功能是重叠的,即它们既能够降解机体受损伤后产生的变性蛋白质,又能够作为分子伴侣结合在变性蛋白质上防止蛋白质的聚集,并帮助变性的蛋白质恢复其天然结构和活性。这种重叠性就大大提高了HSPs在应激反应中的作用效率。但是,为什么一些变性蛋白走降解途径,而一些走复性途径,目前还不清楚。有作者认为,当蛋白发生可逆变性时,它们会在HSPs的协助下走复性途径;当蛋白发生不可逆变性时,它们会在HSPs及其他蛋白(酶)的

感谢北京师范大学生命科学院薛绍白教授对本文的指导和审改。

参与下走降解途径^[12]。

下面,本文主要集中讨论一下真核生物和原核生物中,负责降解应激反应中受损多肽的热休克蛋白和蛋白水解酶。

一、大肠杆菌(*E. coli*)中参与 变性蛋白降解的热休克 蛋白和蛋白水解酶

在大肠杆菌中,大部分变性蛋白在胞质内降解是由蛋白水解酶 La 和蛋白水解酶 Ti 完成的。两者都是 ATP 依赖的蛋白水解酶,正常情况下,两者都是构成性表达,但当细胞处于应激条件下时,它们又呈现出诱导性表达,表达量比前者增加 2—4 倍^[13-15]。

1. 蛋白水解酶 La

蛋白水解酶 La, 又称 Lon 蛋白水解酶(Lon), 具有 ATP 依赖性, 由 4 个相同的亚基组成, 每一亚基 783 个氨基酸。对其活性位点的抑制剂研究和突变分析表明, 它是一种新的丝氨酸蛋白水解酶^[16-18]。

Lon 具有双重作用。首先, Lon 催化一些关键调节蛋白的降解^[19, 20], 其中对 SulA 和 RcsA 研究的最为清楚。如 DNA 一旦受损伤, SulA 的合成增加, 就可抑制细胞分裂。损伤被修复后 SulA 合成受到抑制, Lon 快速降解 SulA, 使得分裂继续进行; 在应激反应中, Lon 促进异常蛋白质的降解。它的底物有刀豆氨酸蛋白, 嘌呤霉素基肽, 错义蛋白质和无义片段^[19, 20]。实际上, 大肠杆菌中大约有一半以上的异常蛋白质降解是由 Lon 负责的。

一个有趣的矛盾存在于 Lon 蛋白水解酶对底物的识别方面。虽然 Lon 催化像 SulA 这样的底物在很大的特异性, 但是, 任何一种蛋白质, 一旦失活, 几乎都能被 Lon 识别。根据 Lon 这种对异常蛋白质的优先识别性, 以及可被热或其他胁迫诱导推测, Lon 的作用在于减少胁迫过程中的变性蛋白质。然而, 与野生型细胞相比, Lon 突变体对热并不敏感, 并且像野生型那

样对热有同样的耐受性, 因此, Lon 蛋白水解酶在应激反应中的详细作用和作用机制还有待进一步研究。

2. 热休克基因 DnaK、DnaJ、GrpE、GroEL 和 GroES

无论是 Lon⁻ 还是 Lon⁺ 大肠杆菌, 当其调控热休克基因表达的因子 σ^{32} 发生突变, 不但造成 HSPs 表达量的减少, 而且还影响异常蛋白质的蛋白水解过程^[21]。另外, 一些热休克基因, 如 DnaK、DnaJ、GrpE 和 GroEL 的突变, 都可导致变性蛋白质降解过程的阻断^[22]。这说明, 除 Lon 外, 其他一些 HSPs 在异常蛋白的降解中也发挥重要作用。

近来一些工作表明, 蛋白水解底物, Lon 和其他 HSPs 间有着一些直接联系。DnaK、GrpE 和 Lon 能与快速降解变性蛋白的碱性磷酸酶突变株产生共沉淀^[23]。另外, 用亲和色谱法可使异常蛋白质与 Lon、DnaK、GrpE 和 GroEL 结合^[24]。在后者的研究中, GroEL 和 DnaK 与蛋白水解底物直接结合。Lon 与蛋白水解底物是独立地结合还是同 HSPs 形成一复合物, 目前还不清楚。

HSPs 不仅能与 Lon 合作发挥重要降解作用。而且(在 Lon⁻ 中), HSPs 的过量表达可增强对脯氨酸片段的水解^[21, 22]。另外, DnaK、DnaJ 和 GrpE 是一些非 Lon 底物的蛋白降解所必需的, 或许 HSPs 与几种不同的蛋白水解酶协作促进异常多肽链的降解。

HSPs 还可独立地形成蛋白水解复合物, 并对细胞内各种蛋白水解底物流动和转运产生影响。例如, DnaK、DnaJ、GrpE、GroEL 和 GroES 突变体内都有大量的 RNA 聚合酶亚基聚集成不溶性复合物, 在野生型细胞中, 这些亚基因不形成不溶性复合物而被快速降解掉。所以, HSPs 可能通过抗聚集作用来防止亚基聚集形成的抗降解构型。

以上研究表明: HSPs、DnaK、DnaJ、GrpE、GroEL 和 GroES 促进胞内蛋白水解可能有两种不同途径。一方面, HSPs 能够与蛋白水解酶

复合物直接结合形成复合物,或保持底物处于对蛋白水解酶敏感的构型,或使蛋白水解酶本身处于更有活性的构型,从而使变性蛋白被快速降解。实际上,与 GroEL 结合的底物处于一种对蛋白水解酶特敏感的构型^[25]。另一方面, HSPs 不是直接与蛋白水解酶作用,而是通过防止未折叠蛋白质的聚集,增加敏感底物的浓度,间接促进蛋白水解。

3. 蛋白水解酶 Ti

蛋白水解酶 Ti, 又称 Clp 蛋白水解酶 (Clp), 负责大肠杆菌中 15% 的变性蛋白降解, 其分子量为 750KD, 由两个不同的亚基 ClpP 和 ClpA 形成异二聚体^[26]。ClpP 的分子量为 21.5KD, 在体外, 它本身可以作为一种 ATP 依赖的丝氨酸蛋白水解酶, 降解肽段和短的多肽。但是, 如果不与 ClpA 结合, 它不能降解更大的蛋白底物。ClpA 是 ATP 依赖的 Clp 的调节子, 它是一种分子量 83KD 的 ATPase, 在 ATP 存在下, 优先与 ClpP 结合。ClpA 与 ClpP 的结合及蛋白水解酶对底物的降解, 都离不开 ATP。

与 Lon (其正常底物已知) 不同, Clp 的正常生理作用很难确定。但是原核生物的 Clp 和真核生物的 26S 蛋白水解酶体有很大的结构相似性^[26], 它们都是圆柱状结构, 都与 ATP 依赖的调节组分联系, 并且都识别一些相同的底物, 表明原核生物和真核生物的蛋白水解酶是功能同源物。然而, 这些观察仍然不能阐明 Clp 在大肠杆菌中的生物学功能。

Clp 在应激反应中处理受损蛋白质的功能也是不详的。虽然一经热休克, 其催化亚基的合成增高 2 倍^[15], 但 ClpP 突变体在生长过程中对热并不敏感, 对极端胁迫也不表现升高的敏感度。同样, 在调节亚基 (ClpA) 突变体中也观察不到与胁迫有关的表型。与调节亚基有关的蛋白质 (像 HSP104) 对胁迫耐受有很大影响, 但是它们的耐受功能和异常蛋白质降解的关系尚未搞清楚。

4. 蛋白水解酶 DegP

这是一种热诱导的蛋白水解酶, 它对协助大肠杆菌处理周质中的胁迫损害具有重要作用。DegP 是一种周质中的丝氨酸蛋白水解酶, 分子量 48KD, 它具有强烈的热诱导性^[27]。DegP 突变阻碍周质中的蛋白降解, 但对胞质蛋白和融合蛋白并无影响^[28, 29]。虽然我们对 DegP 了解不多, 但它给我们提供了一个很好的证据: 蛋白水解在应激反应中具有重要的生理作用。

二、真核生物中异常蛋白质的降解

1. 依赖于泛素的蛋白降解系统

真核生物的许多蛋白质是在细胞质中通过泛素系统降解的。在应激反应中依赖于泛素的蛋白降解功能有两种途径。第一, 在这一降解过程中一些关键的反应由热诱导的蛋白质催化。第二, 泛素系统负责真核生物中大部分应激损伤的多肽链的修复。当培养细胞面对突然升高的温度时, 在正常情况下长期存在的蛋白质就会被急剧降解^[30]。这种蛋白水解的增高与游离泛素的减少及多聚泛素-蛋白质复合物的增多相一致^[30]。另外, 一个含有温度敏感 E1 酶 (泛素活化酶) 的突变株, 对温度的急剧升高不能做出相应的反应, 从而不能在高温下生长。

(1) 泛素 (ubiquitin) 在大多数真核生物, 泛素先被合成一个多聚蛋白质, 随后逐渐变为单个的泛素单位^[31, 32]。所有实验证明, 这些多聚蛋白质是热诱导的^[31]。遗传证据也表明胞内游离泛素的增多是细胞应激反应的一个重要部分。虽然在正常温度范围内酵母 (*S. cerevisiae*) 多聚泛素 (UBI4) 突变体生长速度与野生型酵母的相同, 但是, 一旦被长久置于较高温度或饥饿, 或氨基酸类似物环境中, 它们比野生型要更为敏感。然而, UBI4 缺失的细胞, 并没有丧失对较短的高温耐受能力。

在 *S. cerevisiae* 中, 多聚泛素基因 UBI4 可为应激状况下的酵母细胞提供其所需求的泛

素。正常情况下,泛素由 UBI1、UBI2、UBI3 基因合成,这些基因又都分别编码融合蛋白——N-末端为泛素,C-末端为核糖体蛋白^[33],这些蛋白在合成后将被降解。泛素与核糖体蛋白的短暂接触好像是促进核糖体的组装,这表明泛素可能是其融合的蛋白的分子伴侣^[33]。具体机制现在还不详,但很可能,泛素是一种既能降解蛋白质又可作为蛋白质折叠和加工过程中分子伴侣的热休克蛋白。

(2) 泛素共轭酶 (ubiquitin-conjugating enzyme E2) 泛素共轭酶(E2)催化泛素转移到水解底物上。现已从不同生物体中发现 30 个以上的基因编码 E2 酶^[34]。*S. cerevisiae* 含有 E2 基因的一个必需的亚家族,UBC4 和 UBC5 是其中之一,它们编码几乎相同的热诱导的蛋白质^[35]。UBC4/5 对细胞在应激状况下的存活是必需的。UBC4/5 双突变体不能在高温下存活,并且对氨基酸类似物非常敏感。除了可被高温诱导外,镉处理同样可以使 UBC4 和 UBC5 表达量增高^[36]。UBC4/5 双突变体对镉极为敏感,表明这些蛋白质也在镉损伤的蛋白质降解中起作用。

(3) 泛素连接酶 (ubiquitin-protein ligase E3) 将特定的底物导向依赖于泛素的蛋白降解系统降解需要 E2 酶和 E3 酶。到目前为止,酵母的 Ubr1 蛋白是唯一功能被研究的较清楚的 E3 酶。Ubr1 识别含有不稳定 N 末端残基的底物。Ubr1 蛋白不是热诱导的,Ubr1 突变体对热和其他应激并不比野生型的敏感,这就表明 N-末端识别规则在应激反应中并不发挥重要作用。另外,真核生物中某些具有分子伴侣功能的 HSPs 可能具有 E3 样的功能,将胁迫受损的蛋白导向降解系统。

(4) 26S 蛋白水解酶 (26S protease) 负责泛素标记的底物降解的蛋白水解酶是一个大的、含多个催化亚基的 ATP 依赖性酶,即 26S 蛋白水解酶。这个复合物包括 20S 蛋白水解酶和其他几个蛋白质(分子量 35—119KD)^[37]。其中一个高分子量的哺乳动物 26S 蛋白水解酶

亚基 S4,属于一个新的 ATPase 家族^[38]。S4 在第一个 ATP 结合区与大肠杆菌的 ClpA 有着微弱的同源性,这可能表示 26S 蛋白水解酶是细菌 Clp 酶的功能同源物。

虽然 26S 蛋白水解酶的大部分成分并非热诱导的,但它在应激反应中仍然占有很重要的地位。蛋白水解酶基因突变的酵母,对高温和氨基酸类似物都很敏感。

2. 溶酶体蛋白降解系统

真核细胞内的蛋白水解是由有特异性的泛素蛋白降解系统和非特异性的溶酶体蛋白降解系统负责的。真核生物中,90%以上的长寿命蛋白和一部分短寿命蛋白,都是在溶酶体中以非特异性方式被降解的^[39]。从外环境中进入细胞(通过胞饮和内吞作用)的蛋白质也在其中降解。然而,最近研究发现,HSC70 可结合到 N-末端具有 KFERQ 序列的蛋白上,协助其导向溶酶体,溶酶体蛋白水解酶可再特异地降解这些蛋白质^[40,41]。胞内蛋白在溶酶体内的降解大多发生在非应激情况下。最新研究发现,经热诱导,溶酶体中一种 65/85KD 的酸性蛋白水解酶表达量增加,活性增强,并推测其在热休克反应中的作用可能是彻底降解那些经特异性蛋白降解系统初步降解的变性蛋白片段,以防产生有害累积^[12,42]。

3. 依赖于泛素的蛋白降解系统与溶酶体蛋白降解系统的联系

依赖于泛素的蛋白降解系统与溶酶体蛋白降解系统有一定联系。溶酶体的蛋白降解作用也可能依赖于泛素途径,缺少泛素通路成分的饥饿细胞,其溶酶体蛋白水解率也降低^[43]。当溶酶体蛋白水解酶被抑制后,在溶酶体中就会发现泛素化的蛋白质累积^[44]。推测,在应激条件下,两个蛋白质降解系统可能有两种降解机制。第一,胞内蛋白只有经泛素化后才能被导向溶酶体内降解。当细胞发生蛋白质不能与泛素连接突变时,在高温下蛋白降解受抑制。在应激条件下,胞内蛋白特异地被导向溶酶体中有描述^[45],并且游离的泛素^[46]和泛素化的蛋白

质^[47]都已在溶酶体中发现。第二,泛素系统直接或间接地参与自体消化空泡的构建、成熟或功能发挥。例如,一个必须在自体消化泡内降解的蛋白,可能必须与泛素连接才能被激活;或者,一个抑制自体消化泡构建的短寿命蛋白,可能必须通过泛素途径降解来消除其抑制作用和允许自体消化泡构建的发生。Dunn 研究发现,应激诱导后,自体消化泡从粗面内质网的无核糖体区构建^[48]。这些新生成的自体消化泡发育成成熟的消化泡要经过一系列复杂过程^[49],可能这一复杂过程的每一步都需要泛素的活化和连接。

结 语

这些年,对热休克蛋白和蛋白水解酶的研究有了很大进展,对其生化特性、相互关系及其与靶蛋白的关系以及在应激反应中的作用都有了较多的了解。然而,未知的东西尚很多。下一步的研究将主要集中在三个方面:(1)在变性蛋白的复性及降解过程中,热休克蛋白和蛋白水解酶如何相互协同作用及作用本质;(2)热休克蛋白和蛋白水解系统在特定类型细胞和特定有机体的生理过程中的作用;(3)从生物进化的角度阐明生物适应环境(包括生活过程、发育过程、病理过程等的内外环境变化)的分子机制。其中,第一个问题是关键。

参 考 文 献

- [1] Ritossa F. , 1962, *Experientia*, **18**: 571 - 574.
- [2] Tissieres A. , et al. , 1974, *J. Mol. Biol.* , **84**: 389 - 394.
- [3] Schlesinger M. , et al. , 1982, *Heat Shock from Bacteria to Man* (Cold Spring Harbor, NY).
- [4] Ellis R. J. , et al. , 1992, *Annu. Rev. Biochem.* , **60**: 321 - 347.
- [5] Gething M. J. and Sambrook J. , 1992, *Nature* , **355**: 33 - 45.
- [6] Hartl F. U. , et al. , 1992, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* , **21**: 293 - 322.
- [7] Welch W. J. , 1991, *Curr. Opin. Cell. Biol.* , **3**: 1033 - 1038.
- [8] Jayakumar A. , et al. , 1986, *Science* , **232**: 522 - 524.
- [9] Goldberg A. L. , 1972, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **69**: 422 - 426.
- [10] Pine M. J. , 1967, *J. Bacteriol.* , **93**: 1527 - 1533.
- [11] Parsell P. A. and Sauer R. T. , 1989, *Genes Dev.* , **3**: 1226 - 1232.
- [12] 徐存拴等, 1998, *生物化学和生物物理学报* , **30**(2): 179 - 184.
- [13] Goff S. A. and Goldberg A. L. , 1985, *Cell* , **41**: 587 - 595.
- [14] Phillips T. A. , et al. , 1984, *J. Bacteriol.* , **159**: 283 - 287.
- [15] Kroh H. E. and Simon L. D. , 1990, *J. Bacteriol.* , **172**: 6026 - 6034.
- [16] Waxman L. and Goldberg A. L. , 1985, *J. Biol. Chem.* , **260**: 12022 - 12028.
- [17] Chin D. T. and Goff S. A. , 1988, *J. Biol. Chem.* , **263**: 11718 - 11728.
- [18] Amerik A. Y. , et al. , 1991, *FEBS Lett.* , **287**: 211 - 214.
- [19] Gottesman S. , 1989, *Annu. Rev. Genet.* , **23**: 163 - 198.
- [20] Gottesman S. and Maurizi M. R. , 1992, *Microbiol. Rev.* , **56**: 592 - 610.
- [21] Baker T. A. and Grossman A. D. , 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **81**: 6779 - 6783.
- [22] Straus D. B. , et al. , 1988, *Genes. Rev.* , **2**: 1851 - 1858.
- [23] Sherman M. and Goldberg A. L. , 1992, *EMBO J.* , **11**: 71 - 77.
- [24] Sherman M. Y. and Goldberg A. L. , 1991, *J. Bacteriol.* , **173**: 7249 - 7256.
- [25] Martin J. , et al. , 1991, *Nature* , **352**: 36 - 42.
- [26] Maurizi M. R. , 1992, *Experientia* , **48**: 178 - 201.
- [27] Strauch K. L. , et al. , 1989, *J. Bacteriol.* , **171**: 2689 - 2696.
- [28] Lipinska B. and Zylicz M. , 1990, *J. Bacteriol.* , **172**: 1791 - 1797.
- [29] Strauch K. L. and Beckwith J. , 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **88**: 1576 - 1580.
- [30] Parag H. A. , et al. , 1987, *EMBO J.* , **6**: 5561 - 5568.
- [31] Bond U. and Schlesinger M. J. , 1985, *Mol. Cellbiol.* , **5**: 949 - 956.
- [32] Ozkaynak E. , et al. , 1984, *Nature* , **312**: 663

- 666.
- [33] Finley D., et al., 1989, *Nature*, **338**:394—401.
- [34] Tentsch S., 1992, *Annu. Rev. Genet.*, **26**:179—207.
- [35] Seufert W. and Jentsch S., 1990, *EMBO J.*, **9**:543—550.
- [36] Jungmann J., et al., 1993, *Nature*, **361**:369—371.
- [37] Rechsteiner M., et al., 1993, *J. Biol. Chem.*, **265**:6065—6068.
- [38] Erdmann R., et al., 1991, *Cell*, **64**:499—510.
- [39] Bohley P. and Seglen P. O., 1992, *Experientia*, **48**:1519—1557.
- [40] Chiang H. L., et al., 1989, *Science*, **246**:382—385.
- [41] Dice J. F., et al., 1994, *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. New York Cold Spring Harbor Laboratory Press, 137—151.
- [42] Xu C-S, et al., 1997, *Comp. Biochem. Physiol.*, **117B**:169—178.
- [43] Ronit G., et al., 1991, *J. Biol. Chem.*, **266**:3601—3610.
- [44] Laszlo L., et al., 1990, *FEBS Lett.*, **261**:365—368.
- [45] Dice J. F., 1987, *FASEB J.*, **1**:349—357.
- [46] Schwartz A. L. and Ciechanover A., et al., 1988, *EMBO J.*, **10**:2961—2966.
- [47] Doherty F. G. and Usborn N. V., et al., 1989, *Biochem. J.*, **263**:47—55.
- [48] Dunn W. A., et al., 1990, *J. Cell Biol.*, **110**:1923—1933.
- [49] Dunn W. A., et al., 1990, *J. Cell Biol.*, **110**:1935—1945.

转录因子 E2F 在细胞周期调控中的重要作用

姜勇* 涂晓明 施蕴渝

(*中国科学院结构生物学开放实验室 合肥 230026 中国科学技术大学生命科学学院 合肥 230026)

转录因子 E2F 是细胞周期中 G1 期向 S 期过渡的重要调控因子。它通过与 pRb 及相关蛋白等多种依赖细胞周期的蛋白质及酶的相互作用调控着细胞的增殖。同时, E2F 与肿瘤发生, 细胞凋亡以及抑制肿瘤都有着紧密的关系。因此, 对于它的研究意义重大。本文将从几个方面对 E2F 研究进展等进行综述。

一、E2F 的确定及它的 cDNA 克隆

1986 年 Kovsdi^[1]等利用胶滞后 (gel shift mobility assay) 实验研究腺病毒感染细胞的核抽提物与腺病毒的 E2 启动子相互作用时, 发现了一个与 SP1 等已确定的细胞内转录因子不同的新的转录因子, 命名为 E2F。应用足迹法 (Dnase I footprinting) 实验确定了这种转录因子相结合的 DNA 序列为 TTTCGCGC。同时, 在非腺病毒感染的细胞中也探测出了这种转录因子。说明, 这种与 E2 启动子相结合的转录因子

是胞内转录因子。Yee^[2]等进一步确定 E2F 与 DNA 特异性结合后的刺激转录作用。直到 1991 年, 分别有几个不同的研究小组发现了 pRb 和 E2F 的相互结合, 及这种结合的复合物与细胞增殖控制的密切关系。利用 E2F 与 pRb 相结合的特性, 两个研究小组几乎同时分别从 Nalm6 细胞的 λ gt11 表达文库和 Akata 细胞的 λ gt11 的表达文库中, 筛选了一个编码 E2F 的 cDNA 克隆^[3,4]。这种克隆产物的抗体可与细胞抽提物中的 E2F 活性蛋白免疫沉淀; 当细胞抽提物与 pRb 抗体免疫沉淀时, 这种克隆产物也能被免疫共沉淀。这种克隆产物表达蛋白也和含 E2F 识别序列的 DNA、RB 蛋白、腺病毒 E4 产物结合。这种克隆产物表达在转染的细胞内能刺激依赖 E2F 位点的转录。所有结果都说明这种产物就是 E2F。称之为 E2F-1。

本课题受中国科学院“九五”基础性研究基金资助, 项目号: J-6-07。