

- [17] Fu, H., and Park, W. D., 1995, *Plant Cell*, **7**: 1369 - 1385.
- [18] Chourey, P. S., and Nelson, S. E., 1976, *Biochem Genet*, **14**: 1041 - 1055.
- [19] Zrenner, R., et al., 1995, *Plant J*, **7**: 97 - 107.
- [20] Sun, J., et al., 1992, *Plant Physiol*, **98**: 1163 - 1169.
- [21] Demnitz-King, A. C., 1993, Phd dissertation (Wye, UK: London University).
- [22] Amor, Y., et al., 1995, *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**: 9353 - 9357.
- [23] Carlson, S. J., and Chourey, P. S., 1996, *Mol Gen Genet*, **252**: 303 - 310.
- [24] Ruan, Y. L., and Patrick, J. W., 1995, *Planta*, **196**: 434 - 444.
- [25] Barry, J. M., et al., 1995, *Planta*, **196**: 327 - 334.
- [26] Laporte, M. M., et al., 1997, *Planta*, **203**: 253 - 259.
- [27] Fieuw, S., and Willenbrink, J., 1987, *J Plant Physiol*, **131**: 153 - 162.
- [28] Lingle, S. E., Dunlap, J. R., 1987, *Plant Physiol*, **84**: 386 - 389.
- [29] Hubbard, N. L., Huber, S. C., and Pharr, D. M., 1989, *Plant Physiol*, **91**: 1527 - 1534.
- [30] Moriguchi, T., and Yamaki, S., 1990, *J Am Soc Hort Sci*, **115**: 278 - 281.
- [31] Miron, D., and Schaffer, A. A., 1991, *Plant Physiol*, **95**: 623 - 627.
- [32] Dali, N., Michaud, D., and Yelle, S., 1992, *Plant Physiol*, **99**: 434 - 438.
- [33] Komatsu, A., et al., 1999, *Plant Sci*, **140**: 169 - 178.

p300/CBP 核蛋白与基因转录活化

杨在清 甘莉 夏涛

(华中农业大学生命科学技术学院 武汉 430070)

过去的研究已观察到,大多数核受体与一种称作“全功能转录因子”之间存在着功能联系。因此,许多研究都趋向致力于寻找这种与多个转录因子相结合,并行使其转录调节功能的中间结合蛋白(或辅活化因子)。现已了解到这种结合蛋白在核受体与转录机器(transcriptional machinery)之间起着桥梁作用。Onate等首先了解到一种可与类固醇受体结合的一类固醇-受体辅活化因子(Steroid-receptor co-activator, SRC),该因子可与几种核激素受体的 AF₂ 区结合^[1]。但核受体是如何与 SRC 结合,如何转移,如何促进转录活化作用,又是如何接近大分子核蛋白-CREB 结合蛋白并与之结合的? 本文将叙述这方面的研究近况。

一、p300/CBP核蛋白的基因结构

CBP(CREB-binding protein)是一种大分子核蛋白,可与被 PKA 磷酸化的转录因子-CREB 结合^[2],因此被称作 CREB 结合蛋白。共转染

及生物化学的研究发现, CBP 与 CREB 在体外具有功能相关,而在体内可增强 CREB 介导的转录作用。p300 是另一个基因编码的核蛋白,它与 CBP 在功能及性质上十分相似。DNA 序列分析表明,两种蛋白质在基因结构上也显示出惊人的一致,而且均具有 5 个突出的结构域(图 1)。

当 PKA 缺乏或 CREB 分子中主要的 PKA 磷酸化位点缺失时, CREB 将不被磷酸化^[3]。向细胞内微注射源于 CBP 或 p300 分子中都存在的保守结构肽段的抗体时,可阻断 CREB 诱导的转录作用。这表明,经 PKA 磷酸化的 CREB 是与 CREB 结合而表现其活化功能的。尽管在基因表达的 PKA 依赖性活化作用中, CBP 的基本功能尚有争论,但 CBP 与 CREB 结合,进而调控基因转录这条主线是不容置疑的。

Eckner 等根据腺病毒 E1A 能与 p300/CBP

国家自然科学基金资助项目,批准号 39870595。

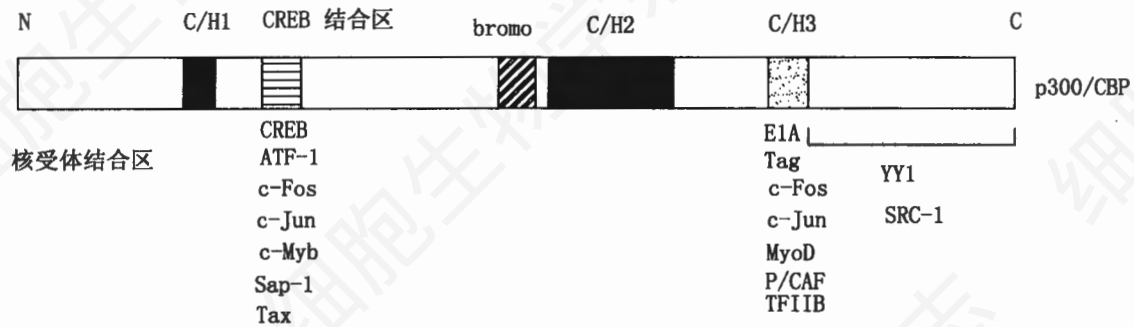


图 1 p300/CBP 的共同保守结构域示意图^[1]

p300/CBP 具有 5 个共同的保守结构域,图中黑框是 3 个半胱氨酸/组氨酸结构域,简图还表示了结构域中各种因子作用的相对位点。

结合的原理,分离了 p300 的 cDNA。E1A 在细胞及病毒基因的表达中具有抑制和活化双重性。采用 p300 突变体的研究表明,以 E1A 介导的带 SV 增强子表达基因,由于 p300 突变体不能与 E1A 结合,结果大大地减弱了 E1A 对其增强子的抑制效应^[4]。这表明在基因转录中,p300 与其增强子有依赖性关系。现已发现大量的能与 p300/CBP 结合而形成复合物的转录因子。在这些转录因子中,除了分子中具亮氨酸拉链的蛋白质以外,还有许多其他转录活化因子,如 YY1^[5]、c-Myb^[6]、Tax^[7]、Hox^[8]、肌细胞 bHLH 蛋白^[9]以及 Sap-1^[10]。

p300/CBP 基因中 Bromo 结构序列的存在,为 p300/CBP 的转录活化功能提供了依据。p300/CBP 的 C-末端活化结构域可与基础转录因子 TF II B(Transfer factor II B)结合,也可与 p300/CBP 相关因子(p300/CBP-associated factor, p/CAF)作用^[11];而 N-末端活化结构域则可与 TBP(TATA box binding protein)结合^[12]。以上两个活化结构域的意义以及在体外与 p300/CBP 间的相互作用已有报道。例如,缺乏 TF II B 和 p/CAF 作用结构域的 CBP 分子仍有增强 CREB 或 ATF-1(activating transcription factor-1)依赖性转录的作用^[13]。另外,p300/CBP 可紧密地与 RNA 聚合酶 II 全酶(Pol II Holoenzyme)结合,也可与辅活化子 ACTR 和

SRC-1^[14]结合。ACTR 和 SRC-1 在激素依赖性作用方式中可与多种核受体结合,而且这两种辅活化子还显示出 p/CAF 活性。上述表明,p300/CBP 分子可与众多转录活化因子结合,形成一个具有调控功能的大分子复合体。但由于 p300/CBP 并不表现出直接与 DNA 结合,因此,只能将其归属于辅活化子。按照这种概念,p300/CBP 如被融合到一个异源 DNA 连接结构域中,他将促进基因表达,这方面的研究工作仍在进行之中。

在激素信号应答中,激素受体与辅活化子-p300/CBP 是如何进行结合并行使其功能的?目前,尚不能满意地回答这一问题。有报道认为,一种富含亮氨酸的模体 motif(LXXLL:L 表示亮氨酸,X 表示任一氨基酸)参与了这种结合。在核受体中,Src 和 CBP 家族成员的相互作用,似乎就借助了这种模体,如 SRC-1 分子中就含有四个 LXXLL 模体。该模体与雌激素受体结合,并以一种配体依赖性方式介导靶基因的活化。

核因子复合物中的富亮氨酸模体并非通常的亮氨酸拉链结构模体(Motif),例如,这种重复的亮氨酸残基组成的模体可决定某些核因子的二聚化,另外,该二聚化作用还与结合蛋白质分子中是否存在间隔的极性氨基酸残基,这种极性残基可以盐桥的形式进一步稳定同源和异源

二聚体。Torchia 等还提出了在激素诱导下, LXXLL 模体中的氨基酸残基可以决定核受体与辅活化因子之间的装配, 如 LXXLL 模体内第三个氨基酸是酸性氨基酸, 就对雌激素受体间的作用不利^[15]。尤其是 CBP 分子中 LXXLL 模体的第三位氨基酸, 如含有一个谷氨酸残基, 那么它与雌激素受体的 AF₂ 结构域的亲和力就会小于与 SRC-1 中相应模体的亲和力, 因为 SRC-1 相应模体的相同位置上是一个碱性的精氨酸。由于雌激素受体与 CBP 和 SRC-1 的亲和力具有显著差异, 这种亲和力的差异可被用于体内核受体家族成员与辅活化因子的结合差异性研究。

另外, CBP 分子内存在两个与受体结合有所不同的结构域, 即分子的 N-末端 101 位氨基酸可与目前研究过的所有核受体结合; 而另一结构域 356-395 位的氨基酸与视黄醇 x 受体有较弱结合, 但不与视黄酸或甲状腺素受体结合。

结构分析还表明, CBP 分子中含有半胱氨酸/组氨酸结构域, CBP 可以通过这一结构域与 E1A、STAT-1 (Signal transducer and activator of transcription-1)、Fos、p/CAF 以及 RNA 解旋酶 A 结合。由于 E1A 可同其他活化因子竞争地与 P300/CBP 结合, 因此, E1A 常被用于抑制细胞分化机理的研究。

二、p300/CBP 与信号传递

大多数转录因子的共同特征是可与 p300/CBP 核蛋白结合, 但其活性受胞外刺激触发的胞内信号传递途径变换的调节。因此, 上述的活化因子在不同组织中都对不同原始刺激产生应答。非常有意义的例子是 CREB 在大脑中参与了海马中的长期记忆的建立, 包括调节昼夜节律。其调节作用与 CREB 的磷酸化和脱磷酸化而应答光的刺激有关^[16]。

类固醇、甲状腺素、视黄醇、维生素 D 都可与核激素受体结合, 进一步与启动子元件作用而调节转录, 这与 p300/CBP 活化 RNA 聚合酶

II 有关。由此表明, p300/CBP 这种巨大的核蛋白分子可与多种基础转录因子复合物 (如细胞因子和应激因子) 和核受体两大类蛋白质结合而行使其辅活化作用。腺病毒 E1A 癌基因蛋白及 SV40 的 T 抗原可阻碍 p300/CBP 与活化因子间的结合, 可以解释这种作用机理^[17] (图 2)。

类固醇激素可以诱导 CREB 的磷酸化, 磷酸化的 CREB 再与 p300/CBP 整合, 并对类固醇激素的作用产生负效应, 这可以建立一种平衡, 即一方面由于激素结合而引起的 CBP 作用的增强, 另一方面由于类固醇激素受体的磷酸化或 PKA 引起的 CBP 磷酸化使 CBP 的作用减弱, 这种作用常常是一个信号通路与另一个信号通路之间的相互拮抗作用。

SRC 蛋白通过与 p300/CBP 的结合来介导核受体的活化作用。p300/CBP 共整合子相关蛋白 (p300/CBP co-integrator-associated protein, p/CIP) 是 SRC-1 家族成员之一, 与其他的 SRC 成员相比, 它不仅作为重要的核受体活化因子, 而且在应答干扰素 γ 和佛波脂的信号系统中也显得非常重要。但由于它与其他 SRC 成员的结构非常相似, 因此, 了解其与 p300/CBP 结合的分子特异性以及同其他成员的功能差异却十分困难, 这有待于对 p/CIP 及其 SRC 家族其他成员基因的核苷酸序列的进一步了解和家族成员基因的缺失来比较其对激素的应答差异。

综上所述, 由于 p300/CBP 在已知各种转录活化因子与转录机器之间的相互作用及调控中起着重要作用, 因而近年来对 p300/CBP 及其相关因子的研究进展很快, 尤其发现了与之结合并直接与转录机器作用的 RNA 聚合酶 II 全酶与核组蛋白乙酰基转移酶 (Histone acetyltransferase, HAT) 之间的相互作用。Struhl 认为, 在 p300/CBP 的作用下, 组蛋白乙酰基转移酶对转录机器的作用存在选择性和非选择性, 并提出了三种模型: ①乙酰化无靶效应, 即乙酰化发生在启动子和非启动子部位。②乙酰化有

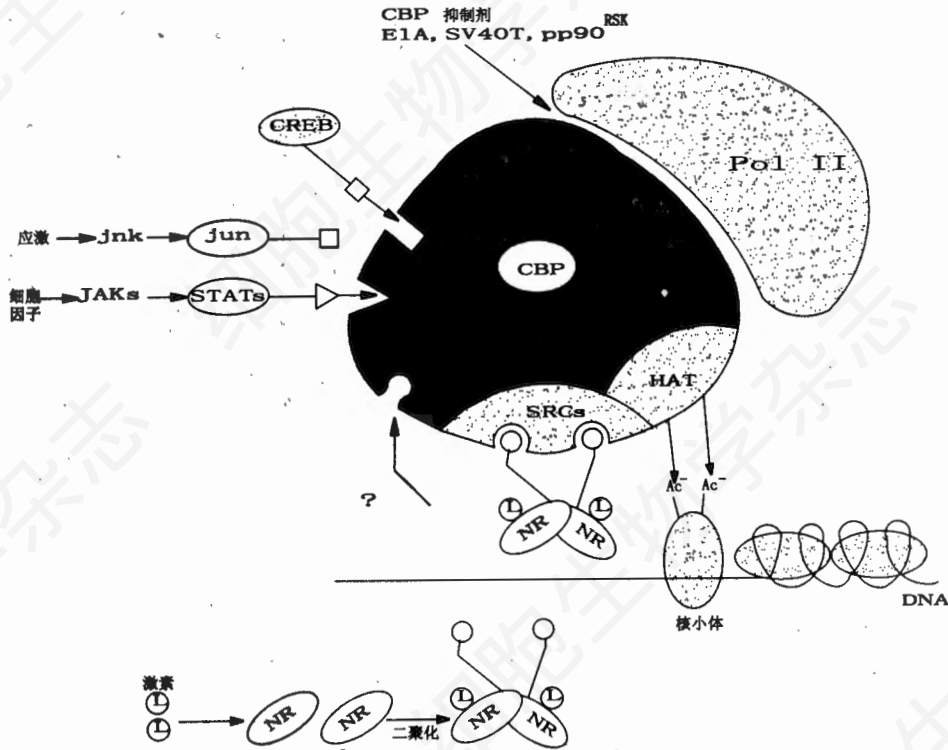


图2 CBP介导的信号依赖性转录示意图^[17]

在应答各种刺激中, CBP与各种信号依赖性因子相互作用, 这些因子包括: CREB、Jun、STAT-1和2、核激素受体(NR)。似乎也与类固醇激素受体辅活化因子(SRC)形成组成性结合, 同时SRC可以识别配体(L)结合的核受体。核受体-辅活化因子复合体通过与RNA聚合酶II复合体结合, 并通过其内源组蛋白乙酰基转移酶(HAT)活化并转移乙酰基(Ac)而刺激靶基因的表达。

靶效应地发生在启动子部位, 但对转录的选择性只涉及到组蛋白乙酰化状态时启动子的固有差异。③乙酰化是通过基因特异性活化蛋白对特异启动子部位的乙酰化作用, 从而导致选择性地影响转录^[18]。虽然这些模型尚无定论, 但它对进一步了解p300/CBP的基因转录调控机理提出了新的思路。

摘 要

CREB结合蛋白和p300都是分子量很大的核蛋白质。由两个特殊基因编码, 但两者在结构模体上高度相似, 均具有调节基因转录和细胞生长的功能, 而且, 其基因在所有的哺乳动

物细胞中表达(至少现在还没有例外)。p300/CBP在细胞中可与多种基因转录活化因子结合而形成辅活化子复合体, 在介导各种转录因子的基因转录活化作用中起着重要作用。

参 考 文 献

- [1] Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ & O' Malley BW, 1995, *Science*, **270**: 1354 - 1357.
- [2] Chrivia JC, Kwok RPS, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR and Goodman RH, 1993, *Nature*, **365**: 855 - 859.
- [3] Knok RPS, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bächinger HP, Brennan RG, Roberts SGE, Green MR and Goodman RH, 1994, *Nature*, **370**: 223 - 226.
- [4] Eckner R, Ewen ME, Newsome D, Gerdes M, Decaprio JA, Lawrence JB and Livingston DM, 1994,

- Genes Dev.*, **8**:869-884.
- [5] Lee JS, Galvin KM, See RH, Eckner R, Livingston D, Moran E and Shi Y, 1995, *Genes Dev.*, **9**:1188-1198.
- [6] Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Hou DX, Yasukawa T, Kaneilshii C, Takahashi T and Ishii S, 1996, *Genes Dev.*, **10**:528-540.
- [7] Suzui T, Uchida-Toita M, Yoshida M, 1999, *Oncogene*, **18**:4137-4143.
- [8] Chariot A, van Lint C, Chapelier M, Gielen J, Merville MP, Bours V, 1999, *Oncogene*, **18**:4007-4014.
- [9] Eckner R, Yao T-P, Oldread E and Livingston DM, 1996b, *Genes Dev.*, **10**:2478-2490.
- [10] Janknecht R and Nordheim A, 1996, *Oncogene*, **12**:1961-1969.
- [11] Yang XJ, Ogryzko VV, Nishikawa J, Howard BH and Nakatani Y, 1996, *Nature*, **382**:319-324.
- [12] Yuan W, Condorelli G, Caruso M, Felsani A and Giordano A, 1996, *J. Biol. Chem.*, **271**:9009-9013.
- [13] Bisotto S, Minorgan S and Reh fuss RP, 1996, *J. Biol. Chem.*, **271**:17746-17750.
- [14] Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ and O' Malley BW, 1997, *Nature*, **389**:194-198.
- [15] Frank DA and Greenberg ME, 1994, *Cell*, **79**:5-8.
- [16] Kurokawa R, Kalafus D, Ogliaastro M-H, Kioussi C, Xu L, Torchia J, Rosenfeld MG and Glass CK, 1998, *Science*, **279**:700-703.
- [17] Torchia J, 1997, *Nature*, **387**:677-684.
- [18] Struhl K, 1998, *Genes Dev.*, **12**:599-606.

NFAT 家族蛋白的作用机制

黄朝晖

(无锡市第四人民医院中心实验室 无锡 214062)

王金福

(浙江大学生命科学学院 杭州 310012)

活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cells, NFAT)是一类与众多信号传导途径相联系,具有广泛生理功能的转录因子^[1,2]。NFAT 主要通过受体-Ca²⁺-钙调磷酸酶(calci-neurin, CN)信号路径被激活,从而发挥其基因调控功能。NFAT 的主要功能是诱导多种免疫调控基因的转录, NFAT 在免疫系统外也有较广泛的分布,提示其在这些组织和细胞中也具重要功能。此外, NFAT 还是环孢素 A(cyclosporin A, CsA)和 FK506 等免疫抑制药物的主要靶位点。因此对 NFAT 的研究在免疫应答、基因调控、临床医学等多方面都具有重要意义,从而成为当前生物学和医学的研究热点之一。近年来对 NFAT 家族蛋白的研究取得了一系列重要进展,本文着重介绍了 NFAT 蛋白作用机制方面的研究进展。

一、NFAT 家族蛋白的结构

迄今已发现十几种 NFAT 蛋白;分为

NFAT1/NFATp、NFATc/NFAT2、NFATx/NFAT4/NFATc3 和 NFAT3 四类。这些 NFAT 蛋白都具有一些共同的结构特征,根据同源性可将其分为 3 个区域。

1. 调控区

N 端约 400 个氨基酸残基是与 CN 作用的调控区。前约 100 个残基是一种称为转录激活域(transcriptional activation domain, TAD)的非保守序列。TAD 富含酸性氨基酸和 Pro,一般至少含有一个酸性区。尽管各 NFAT 的 TAD 的保守性较低,但都能有效地执行反式激活功能。虽然 NFAT2a 在相应区域不含这种酸性区,但也具有反式激活功能,可能它是通过与一些特殊的核蛋白作用来实现其反式激活的^[3]。调控区中的其余部分称为 NFAT 同源区(NFAT homology region, NHR), NHR 是由多个保守结构基序(motif)组成的中度同源(23%-35%)序列,这些基序包括 CN 调控的抑制序列(calci-nurin-regulated inhibitory sequence,