

- 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 Rehfuess 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, Ogliastro 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- Ca^{2+} -钙调磷酸酶(cal-cineurin, 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(calcineurin-regulated inhibitory sequence,

CRIS)或称 Ser 富集区 (serine-rich region, SRR) (在 NFAT4 中则称为 Z 区)、一个潜在的核定位信号 (nuclear-localization signal, NLS) 和 3 个 Ser、Pro 富集的 SP 盒^[3,4]。非激活状态 NFAT 的 CRIS 中的 Ser 残基处于磷酸化状态, 形成一种掩蔽 NLS 的构象, 这些 Ser 残基去磷酸化会导致 NLS 的激活。CRIS 的缺失或其中 Ser 的突变都会导致 NFAT 组成型核定位, 而 NLS 的缺失或突变则会导致 NFAT 不能发生核定位。目前, 对于与 CN 结合的具体序列也有了初步了解。Liu 等^[5]发现 NFATx1 含有两个 CN 结合位点 (CN binding site, CNBR), CNBR1 (在 NFAT4/NFAT1 中的对应区域称 C/CM2

序列) 和 CNBR2 (见图 1), 其中保守的 CNBR1 与调控区中的 TAD 发生功能性重叠, 为各 NFAT 成员所共有, 该区缺失也会导致 NFAT 不能发生核定位。此外, 调控区中还含有一个富含 Leu 的核输出信号 (nuclear-export signal, NES), 调控 NFAT 的核输出^[5,6]。通常该 NES 位于 CNBR2 或其对应区域中。例外的是 NFAT4 含两个 NES, NES1 和 NES2 (人 NFAT4 的 NES1 和 NES2 分别位于 31-96 和 99-154 位氨基酸残基间), 两者都能介导 NFAT 的核输出, 其中 NES2 与 CNBR 发生功能性重叠。上述情况提示 NFAT 在与 CN 发生相互作用的同时, 还会掩蔽 NES 的活性。

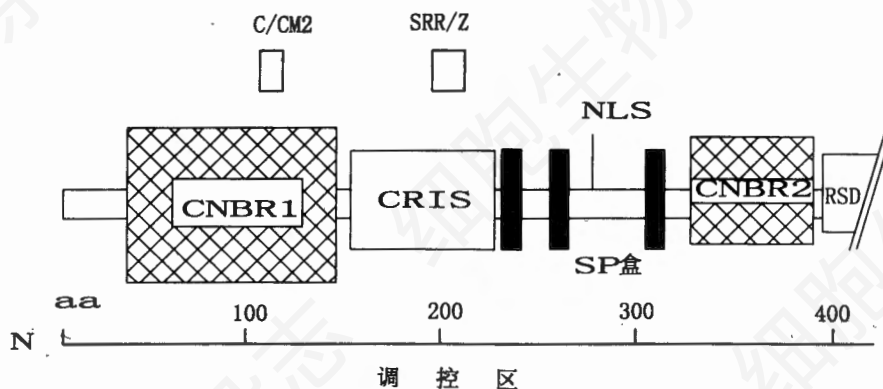


图 1 NFATx1 调控区结构图 (引自参考文献[5] 并经作者改动)

2. DNA 结合域 (DNA binding domain, DBD)

DBD 约位于氨基酸残基 400-700 位之间, 含有一段高度保守的识别环序列 (Arg-Ala-His-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly)。DBD 还含有一个 NLS, 该 NLS 和 NHR 中的 NLS 共同调控 NFAT 的核定位, 也受到 CRIS 中磷酸化 Ser 残基的掩蔽。结构研究揭示 NFAT DBD 的空间结构与 Rel 家族蛋白 DBD 非常相似^[7], 所以又称 Rel 相似域 (Rel similarity domain, RSD)。DBD 是 NFAT 成员中同源性 (66%~73%) 最高的区域, 负责与 DNA 结合以及 AP-1 (activator protein-1) 等转录因子发生协同作用。

3. C 端区

除去调控区和 DBD 外的区域是长度变化较大的 C 端区。C 端区同源性最低, 含有一个 TAD。C 端区中唯一的保守区是 TAD 中一段长约 15 个氨基酸残基的横跨 C 端剪接位点的序列。该 TAD 是 NFAT 主要反式激活区之一, 能够增强 NFAT 与辅激活子或其他基本转录因子的相互作用。可能是由于组织特异性剪接, 不同的 NFAT 该序列不同, 从而表现出不同的反式激活活性^[8]。

二、NFAT 的作用机制

1. NFAT 的激活与核质穿梭 (nuclear/cytoplasm shuttle)

(1) NFAT 的激活与核定位 NFAT 的激

活主要是通过 CN 来实现的,激活后的 NFAT 具有去磷酸化、核定位以及与 DNA 亲和力上升 3 个特征。在静息细胞中,NFAT 位于胞浆中。当细胞被激活时,引发钙动员,胞内 Ca^{2+} 水平上升激活钙调素(calmodulin, CaM),然后 CaM 与 CN 的 A 亚基结合,激活 CN。激活的 CN 与 NFAT 发生直接相互作用,使之调控区中的 Ser 发生选择性地磷酸化从而激活 NFAT,使其原本被掩蔽的 NLS 暴露出来,可被 NLS 受体 importin α 识别,在其作用下转运入核^[3,6,9]。CsA 和 FK506 能经各自受体介导与 CN 结合从而抑制 CN 对 NFAT 的激活。

CN 和 NFAT 激活状态的维持需要连续的钙信号,因此单靠钙库的释放不能满足需要。激活细胞的多种信号(如 T 细胞受体和 CD40)能诱发获能钙(capacitative calcium)通过专门的钙通道流入胞内,补充钙库的耗竭,维持 NFAT 的激活。

(2) NFAT 的核输出 当 CN 活性下降或钙信号中断时,NFAT 在某些激酶的作用下重新磷酸化,NES 的掩蔽被解除,从而能够被核中的核输出受体 Crml 识别,在其作用下,NFAT 被迅速转运出核。Crml 介导 NFAT 核输出时需要 GTPase Ran 参与,以 Crml-RanGTP-NFAT 复合物的形式从核中运出^[10]。NFAT 可通过 CN 和 Crml 竞争结合机制来调控核输出。如 CN 通过与 Crml 竞争结合 NFAT4 调控区中的两个 NES 来抑制 Crml 介导 NFAT4 核输出^[11]。CN 与 NFAT 结合后,在激活 NLS 的同时掩蔽了 NES,从而抑制了核输出,避免了无效核质穿梭。

(3) CN 与组成型激酶的相互作用 NFAT 的核质穿梭主要是通过 CN 与组成型激酶的动力学相互作用来调控的。有多种激酶能逆转 CN 介导 NFAT 的核定位,如 GSK3 和 JNK,但目前对这些激酶还了解甚少。Zhu 等^[11]不久前发现两种抑制 NFAT4 核输入的蛋白激酶,酪氨酸激酶 I a(casein kinase I a,CK I a)和 MEK 激酶 1(MEK kinase 1,MEKK1)。

CK I a 能和 NFAT4 调控区中富含 Ser 的 A 区作用,使之发生选择性磷酸化。磷酸化后的 NFAT4 发生构象变化,使 CK I a 靠近 Z 区,从而催化 Z 区也发生磷酸化。Z 区含有一个 NLS 掩蔽元件,Z 区磷酸化后导致形成一种阻断 importin α 识别 NLS 的构象,即掩蔽了 NLS,从而抑制 NFAT4 的核转运。MEKK1 则通过提高 CK I a 和 NFAT4 的亲和力,促进 NFAT4 的磷酸化。

2. DNA 结合与反式激活

(1) NFAT 的结合位点 NFAT 靶基因中供 NFAT 特异性结合的位点称 NFAT 位点,其共有序列为 GAGGAAAA。多数 NFAT 靶基因的启动子和增强子的一个显著特征是含有多个 NFAT 位点(通常 3-5 个),可能这有助于 NFAT 与其他蛋白发生更高层次的协同相互作用,形成高效的转录复合物。研究提示只有当核中 NFAT 达到允许串联结合多个 NFAT 位点的阈浓度时,在激活的 T 细胞中才能起始 NFAT 依赖性的转录^[3]。除了 NFAT 位点外,NFAT 还能与某些 Rel 位点或 κ B 类似位点结合。如两个 NFAT 能分别与 κ B 类似位点的两个半臂(half-site)结合^[12]。NFAT 和 Rel 蛋白一样还能和 IL-2 及 GM-CSF 启动子中的 CD28 应答元件结合。此外,还发现 NFAT 能和 NF- κ B 竞争结合 IL-4 启动子中的 P 序列。但 NFAT 与这些位点的结合有何功能尚不清楚,很可能是通过与 Rel 蛋白竞争结合特定的 DNA 位点而调控彼此的功能。

(2) NFAT 与 DNA 的结合 NFAT 被激活和核定位后,作为一种反式作用因子与 DNA 结合,激活靶基因的转录,发挥反式激活功能。NFAT 激活后,原本被掩蔽的 DBD 暴露出来,从而与 DNA 的亲和力大大上升,能够和靶基因结合。通过对 NFAT δ DBD/DNA 二元复合物的构象研究揭示:在 NFAT 与 DNA 结合时,首先核心 DBD 与 DNA 发生相互作用,诱导 NFAT 的关键结构元件发生折叠,这些元件是 NFAT 序列特异性识别和与其他转录因子发生

协同作用所必需的。原先各空间上分离的区域通过折叠形成DNA结合界面和一个适于与其他转录因子发生协同作用的界面^[7]。然后NFAT得以与这些转录因子一起组装成转录复合物,激活基因的转录。

(3) NFAT与AP-1蛋白的协同作用
NFAT在结合和反式激活多数靶基因时,需要和AP-1家族蛋白等转录因子发生协同作用。在这些靶基因中,NFAT位点与AP-1蛋白二聚体(Jun/Fos)的结合位点相邻,两位点之间的距离和相对顺序都是确定的,缺失或插入一个碱基都会消除两者的协同结合。许多NFAT靶基因的启动子中都含有支持NFAT和AP-1蛋白发生协同结合的复合元件,称为NFAT:AP-1位点。NFAT1与AP-1二聚体发生协同作用,形成的NFAT1-AP-1-DNA三元复合物的稳定性比NFAT1-DNA要高20倍左右。在没有AP-1蛋白时,NFAT虽然也能与这些靶基因结合,但其与靶基因的亲和力要低的多。对于某些NFAT靶基因,无论是NFAT位点还是AP-1位点的突变都能消除报告基因的转录,表明NFAT对AP-1蛋白的召集是这些基因的转录所必不可少的^[3,7]。因此这些基因的转录激活包括两个方面:一个是NFAT的激活,另一个是PKC/ras路径的激活,后者可诱导AP-1蛋白的合成。除AP-1外,NFAT还能与CREB/ATF、c-Maf等其他bZIP(basic-leucine zipper)蛋白发生协同作用。也有一些NFAT靶基因(如IL-4和TNF- α 基因)不含NFAT:AP-1位点,NFAT在激活这些基因时不与AP-1发生协同作用^[13]。

三、NFAT的选择性基因调控功能及其调控途径

1. NFAT在免疫系统中的功能

NFAT最重要的功能是选择性诱导细胞因子和其他免疫调控基因的转录,从而在免疫应答过程中扮演着中心角色。通常认为NFAT位点的序列多样性及其与其他转录因子结合位

点相对位置的多样化是决定NFAT选择性基因调控的基础。如由于IL-2和IL-4启动子中相应结合位点存在差异,导致NFAT和Oca蛋白发生不同的相互作用,两者在IL-2启动子上发生协同作用,而在IL-4启动子上却相互竞争^[14]。这些可诱导的潜在NFAT靶基因包括:(1)IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、GM-CSF、IFN- γ 、TGF- β 、TNF- α 等细胞因子基因;(2)CD40L、CD25、CD69、CTLA-4、FasL等表面受体基因;(3)NF- κ B1、c-Rel、Oct-2、Nur77等转录因子基因。NFAT通过对这些基因的调控影响免疫细胞的产生、激活、分化、存活和死亡^[3,15,16]。如免疫应答过程中,在NFAT的选择性作用下,每种免疫细胞都会产生一种细胞特异性的细胞因子表达模式,发挥不同的功能。

2. NFAT选择性基因调控的机制

迄今,NFAT选择性基因调控的具体机制尚未阐明,其调控途径可能主要有:(1)NFAT的转录和翻译后调控。NFAT在不同细胞以及细胞不同的发育阶段具有不同的表达,为其发挥不同的功能提供了可能^[7,17]。如NFATc通过可变剪接,在原初T细胞和激活的T细胞中分别表达不同的异型体,而且这些异型体在T细胞和肥大细胞中的表达情况也不同^[18]。(2)核定位层次。研究发现不同的钙峰频率、持续时间和胞内分布都代表了不同的信息,不同的NFAT可能识别不同的钙信号,发挥不同的功能。如在肌肉细胞中,特定的钙信号刺激选择性地诱导NFATc3和NFAT4入核,提示可能各NFAT家族成员具体的核定位机制存在差异。(3)核输出层次。通过GSK3、JNK和CK I α 等激酶调控NFAT的核输出。有些激酶能选择性地作用于某一NFAT,如MAP激酶p38选择性地调控NFAT1的核输出。(4)不同的信号途径以细胞特异性的方式调控不同的NFAT。如抗CD3能选择性地诱导T细胞中NFATc1基因的表达。(5)不同的NFAT通过与细胞特异性的辅助因子作用来发挥选择性

调控作用^[15]。如 bZIP 家族成员 c-Maf 在 Th2 细胞中选择性表达,能与 NFAT 发生协同作用,共同诱导 IL-4 基因的表达,而在 c-Maf 不表达的 Th1 细胞中,IL-4 不表达。

3. NFAT 在免疫系统外的功能

NFAT 在免疫系统外,如心肌、骨骼肌、睾丸和卵巢中也有较广泛分布,提示它在这些组织和细胞中也具重要功能。Molkentin 等^[19]发现 CN 能通过 NFAT3 诱导小鼠心肌肥大,提示 NFAT3 可能在正常发育过程中介导心肌生长。此外,还发现 NFAT2 对于心血管的形成是必不可少的。但目前对 NFAT 的研究多局限于免疫系统,NFAT 在免疫系统外的靶基因有哪些、发挥什么功能以及调控机制如何等问题都有待于进一步研究。

四、结 语

通过对 NFAT 的分子机制的研究,不但极大地促进了我们对免疫系统中可诱导基因的转录的理解,而且对于免疫抑制药物的研制也具有指导意义。此外,由于 NFAT 具有 NLS 和 NES,因此通过 NFAT 研究核输出/入从而研究基因调控也具有特殊意义。但是,受体- Ca^{2+} -CN-NFAT 信号路径诱导基因细胞特异性表达的具体机制尚未得到彻底阐明,NFAT 在免疫系统外的组织细胞中的功能也知之甚少,不同 NFAT 的作用机制和具体功能有何差异以及 NFAT 家族是否还存在其他成员等问题都有待于进一步研究。

摘 要

NFAT 家族蛋白是一类具有广泛生理功能的转录因子,不同的 NFAT 蛋白各具其特定的选择性基因调控功能。NFAT 除了在免疫应答

过程中扮演着中心角色外,可能还具有众多其他功能。NFAT 主要通过 Ca^{2+} -CN 信号路径被激活,NFAT 的激活与核质穿梭主要是通过 CN 与组成型激酶的动力学相互作用来调控的。NFAT 在激活靶基因时常与 AP-1 蛋白或其他转录因子发生协同作用。

参 考 文 献

- [1] Shaw, J. P. et al., 1988, *Science*, **241**: 202 - 205.
- [2] Northrop, J. P. S. N. et al., 1994, *Nature*, **369**: 497 - 502.
- [3] Rao, A. et al., 1997, *Annu. Rev. Immunol.*, **15**: 707 - 747.
- [4] Beals, C. R. et al., 1997, *Genes Dev.*, **11**: 824 - 834.
- [5] Liu, J. et al., 1999, *J. Immunol.*, **162**: 4755 - 4761.
- [6] Zhu, J. Y. et al., 1999, *Nature*, **398**: 256 - 260.
- [7] Zhou, P. et al., 1998, *Cell*, **92**: 687 - 696.
- [8] Imamura, R. et al., 1998, *J. Immunol.*, **161**: 3455 - 3463.
- [9] Hogan, P. G. and Rao, A., 1999, *Nature*, **398**: 200 - 201.
- [10] Kehlenbach, R. H. et al., 1998, *J. Cell. Biol.*, **141**: 863 - 871.
- [11] Zhu, J. Y. et al., 1998, *Cell*, **93**: 851 - 861.
- [12] Chytil, M. et al., 1996, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**: 91 - 100.
- [13] Saccani, S. et al., 1999, *Eur. J. Immunol.*, **29**: 1194 - 1201.
- [14] Oukka, M. et al., 1998, *Immunity*, **9**: 295 - 304.
- [15] Luo, C. et al., 1996, *Mol. Cell. Biol.*, **16**: 3955 - 3966.
- [16] Glimcher, L. H., and Singh, H., 1999, *Cell*, **96**: 13 - 23.
- [17] Pfeuffer, I. et al., 1994, *J. Immunol.*, **153**: 5572 - 5585.
- [18] Shernan, M. A. et al., 1999, *J. Immunol.*, **162**: 2820 - 2828.
- [19] Molkentin, J. D. et al., 1998, *Cell*, **93**: 215 - 226.

《细胞生物学杂志》明年改出双月刊

经中华人民共和国新闻出版署新报刊(2001)059号批准,本刊自2002年起由季刊改为双月刊(逢双月月中15日出版)、大16开本,页码64页,每本定价6元。

欢迎订阅,欢迎来稿。欢迎在本刊投放广告。