

- 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 Rehfuss 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) (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-Ca²⁺-钙调磷酸酶(calmodulin, 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

王金福

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(calmodulin-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。

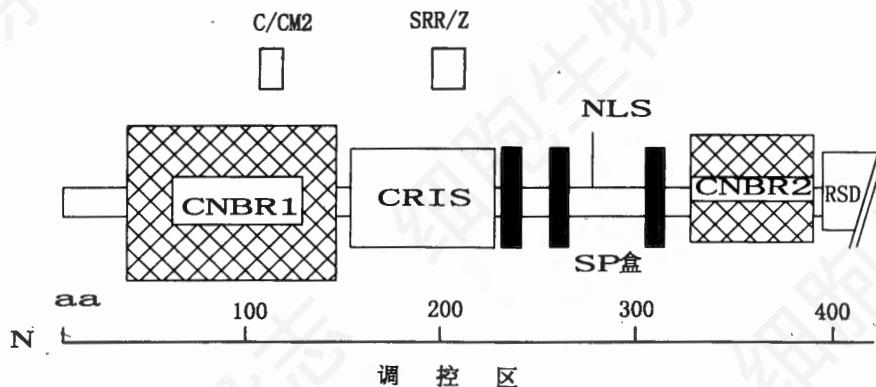


图 1 NFATx1 调控区结构图(引自参考文献[5] 并经作者改动)

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 结合以及与 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 发生选择性地去磷酸化从而激活 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, 酪素激酶 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 NFATc1 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得多。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-leuine 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、CT-LA-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一定指导意义。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-Ca²⁺-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 Ca²⁺-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] Chyttil, 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。