

# NAC(初期多肽相关复合体)及其 $\alpha$ 亚基NACA

刘娇玲 吕晓莉 陈克平\*

(江苏大学生命科学研究院, 镇江 212013)

**摘要** 初期多肽相关复合体(nascent polypeptide-associated complex, NAC)是新生肽链从核糖体上延伸出来第一个接触的异二聚体蛋白复合体, 从古生菌、酵母到哺乳动物都高度保守。NAC是一个具有多种功能的蛋白, 包括保护新生肽链、调控新生肽转位进入内质网和线粒体、肌肉损伤修复等。其 $\alpha$ 亚基NACA/ $\alpha$ NAC(nascent polypeptide-associated complex alpha subunit)主要在转录调控中起作用。此外, NACA还能调控FADD(Fas-associated with death domain protein)所介导的信号转导。在一些病毒性疾病, 如乙肝、丙肝和非洲猪瘟中, NACA能与病毒的某些蛋白相互作用, 致使机体功能紊乱。在老年痴呆症和唐氏综合征患者脑细胞中, 与正常水平相比, NACA表达下调。

**关键词** NAC/EGD; NACA; skNAC; 转录调控; SRP; 内质网; 线粒体; 临床疾病

## NAC (Nascent Polypeptide-associated Complex) and Its Alpha Subunit NACA

Liu Jiaoling, Lü Xiaoli, Chen Keping\*

(Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**Abstract** NAC (nascent polypeptide-associated complex) is the first cytosolic heterodimeric protein complex to contact nascent polypeptide chains emerging from ribosomes and is evolutionarily conserved in the genomes from archaea, yeast to mammals. NAC is found to be a multifunctional protein which can shield nascent chains, regulate nascent chains translocating into endoplasmic reticulum and mitochondria, repair muscle damage and so on. However, its  $\alpha$  subunit NACA/ $\alpha$ NAC (nascent polypeptide-associated complex alpha subunit) is identified mainly functioning in transcriptional regulation. It may play a role in FADD-mediated signal transduction process. Moreover, in many viral diseases, such as the Viral Hepatitis Type B, C and the African swine fever, it is found to be able to interact with the relevant viral protein to cause physiological disorders. Even in the brain tissues of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome, NACA is found downregulated.

**Keywords** NAC/EGD; NACA; skNAC; transcriptional regulation; SRP; endoplasmic reticulum; mitochondria; clinical diseases

NAC(nascent polypeptide-associated complex)是真核生物中含量丰富的一种胞质蛋白, 它能可逆性地与真核细胞L25核糖体蛋白相结合, 位于核糖体新合成多肽的顶端<sup>[1-3]</sup>。从古生菌、酵母到哺乳动物, NAC都高度保守, 其胞内的浓度在不同组织中各不

相同, 从3~10  $\mu\text{mol/L}$ 不等<sup>[4]</sup>。NAC是一种异二聚体蛋白, 由 $\alpha$ 和 $\beta$ 两种亚基组成, 但在原核生物中的同源物至今未发现。尽管从低等的古生菌、酵母到高等的哺乳动物细胞都有NAC基因的表达, 但其在体内的生物学功能至今还不完全清楚。Rospert等<sup>[5]</sup>的

收稿日期: 2014-11-21 接受日期: 2015-03-27

国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2012CB114604)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0511-88791923, E-mail: kpchen@ujs.edu.cn

Received: November 21, 2014 Accepted: March 27, 2015

This work was supported by the National Basic Research Program of China (973 Program) (Grant No.2012CB114604)

\*Corresponding author. Tel: +86-511-88791923, E-mail: kpchen@ujs.edu.cn

网络出版时间: 2015-06-01 15:51

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150601.1551.008.html>

研究显示, NAC的生物学功能可能包括: (1)保护新生肽链; (2)调节新生肽链转位进入内质网; (3)调节新生肽链转位进入线粒体。

此外, 研究还发现, NAC有其他重要的功能, 如能结合到DNA X结上、影响抗癌药物阿霉素的毒性、修复肌肉损伤、提高拟南芥的耐性等。因此, 目前的观点认为, NAC是一种具有多种功能的蛋白。对编码NAC亚基的基因进行突变或敲除, 能对多细胞真核生物产生致死效应<sup>[6-7]</sup>。NAC的两个亚基在细胞内各自有着不同的作用,  $\beta$ 亚基与caspase-3相互作用, 可能参与调控细胞凋亡<sup>[8]</sup>, 而NAC的 $\alpha$ 亚基主要是在转录调控中起作用。

## 1 NAC复合体

NAC复合体被认为是真核生物中第一个能与刚从核糖体上延伸出来的多肽链相互作用的胞质因子, 从古生菌、酵母到人类都高度保守。所有的NAC提取物均由两种多肽成分组成<sup>[9]</sup>, 分别命名为 $\alpha$ NAC和 $\beta$ NAC,  $\beta$ NAC又有 $\beta_1$ NAC和 $\beta_3$ NAC两种亚型。它们在体外和体内都能形成十分稳定的异二聚体复合物<sup>[10]</sup>。NAC复合体在酵母中称为EGD(enhance of Gal4p DNA binding)。酿酒酵母中EGD的三个亚基(Egd2p、Egd1p、Btt1p)分别由EGD2、EGD1、BTT1编码(表1)。人类NAC基因为多基因, 酵母EGD基因也可能是具有多种功能的多基因家族<sup>[11]</sup>。

表1 NAC及其两个亚基  
Table 1 NAC and its  $\alpha$  and  $\beta$  subunits

复合体 Complex	$\alpha$ 亚基 $\alpha$ subunit	$\beta$ 亚基 $\beta$ subunit
NAC	$\alpha$ NAC	$\beta_1$ NAC, $\beta_3$ NAC
EGD (yeast)	Egd2p/Nac1p	Egd1p/Btf3p, Btt1p

### 1.1 保护新生肽链

Reimann等<sup>[12]</sup>发现, 在酵母细胞中,  $\alpha$ 亚基和 $\beta$ 亚基形成NAC是受细胞盐浓度所调控的, 且NAC能否与核糖体结合受 $\beta$ 亚基( $\beta_1$ NAC)所调控。通过估量野生型酿酒酵母细胞中NAC的分子量以及缺失一个或者两个亚基的NAC的分子量, 发现NAC的成分是多变的, 可能还包括一些未知的蛋白质。尽管它有多变性, 但当某一亚基被敲除后, 其他亚基在生理生长温度下表达会下调。同时敲除两个 $\beta$ 亚基基因的酵母细胞不能在37 °C下生存, 可能是因

为缺少 $\beta$ 亚基和 $\alpha$ 亚基结合而形成 $\alpha$ 亚基过量导致的毒性效应。体外实验表明, 哺乳动物NAC能阻止酵母非分泌型新生肽的错误定位。而体内实验表明, 缺乏NAC时, 无信号的转化酶不能进行正常的分泌过程。从酵母细胞在最适生长条件下(28 °C, YPD-培养基)敲除一个、两个或者三个亚基基因所表现出的表型来看, 细胞中可能存在NAC的替代物, 或者细胞可以耐受或修复这种由缺失NAC所带来的损伤。当NAC存在时, 它一直覆盖在新生肽链上以防止其被水解直至肽链长度达到30个氨基酸残基<sup>[13]</sup>。当NAC缺失时, 新生肽链就趋向于水解。因此, Wang等<sup>[13]</sup>认为, NAC通过覆盖在核糖体上新合成肽链的C端, 为从肽酰转移酶中心产生的肽链形成一个保护性的微环境。通过分析NAC各亚基功能, 发现 $\alpha$ 和 $\beta$ 这两个亚基均直接与核糖体上的新生肽链相互作用, 并且一起阻止新生肽链与其他因子间的作用。但是, 单独 $\beta$ 亚基与核糖体结合就可以阻止核糖体与内质网(endoplasmic reticulum, ER)的结合<sup>[5]</sup>。

### 1.2 调节新生肽链转位进入内质网(ER)

新生肽链定位到ER膜的过程要受其信号肽所指导。目前认为, 这一定位过程由信号识别颗粒SRP(signal recognition particle)调节, SRP先结合到信号肽上, 然后引导核糖体/新生肽/SRP复合体到ER膜上, 再与SRP受体结合。而核糖体调节这一过程是通过直接与转位位点结合所调控的。当没有SRP和NAC存在时, 体外组装好的翻译中间体核糖体/新生肽复合体可以高效地结合到微粒体膜上, 随后这些新生肽被高效地转运。去除这些胞质因子也会导致无信号的新生肽的错误定位, 当重新加入这些因子后, 如SRP和NAC, 是否可以使这种高保真度的定位恢复? 研究表明, 在没有SRP存在时, 将NAC从核糖体相关新生肽(ribosome-associated nascent chains, RNCs)上移除后, 含有无信号多肽链的核糖体可以高效地定位到ER膜上的Sec61复合体(内质网上一种通道蛋白易位子的主要成分)上。随后, 跨ER膜间的转运随之发生, 这种转运与分泌型的肽链相比效率很低, 可能是因为信号肽有利于转位孔开放。这种结合又可以被无新生肽的核糖体的结合限制, 似乎这种结合是核糖体和ER膜间固有的亲和力所致。当再加入NAC时, 这种错误的定位就可以被阻止。因此认为, 当NAC结合到无信号核糖体相关新生肽上时, 它就在空间上阻止了核糖体与ER膜的

结合<sup>[14-15]</sup>。而且,只有当新生肽链包含有信号肽时,SRP才能恢复NAC所阻止的核糖体与ER膜间的结合。因此,NAC是一个全局性的能阻止核糖体结合的因子,它是通过调控SRP所调节的信号肽的活性来实现的。SRP、NAC以及信号肽,一起促进核糖体特异地将新生肽链运输到转位位点<sup>[13-16]</sup>。

为了弄清楚SRP、NAC、核糖体-新生肽链三者之间的关系,Powers和Walter<sup>[17]</sup>建立了两种不同的SRP和核糖体-新生肽复合体相互作用的模型。这个模型有两类:一类是对盐有耐性的SRP54和信号序列间的相互作用模型,另一类是对盐敏感的SRP其他成分与核糖体间的相互作用模型。他们最后得出了这样的结论:NAC并不是直接影响SRP对信号肽的识别,而是负调控SRP与核糖体本身的相互作用。这一结论目前还存在争议,其原因可能是SRP和NAC在蛋白定位过程中均对另一方有调控作用。

SRP和NAC通过竞争结合核糖体膜上的附着位点,一起保证共翻译定位的准确性<sup>[15]</sup>。SRP帮助有信号的核糖体的定位,而NAC可以阻止无信号的新生肽定位到ER膜上。最近,NAC能阻止核糖体结合这一理论受到人们的质疑。通过仔细地研究不同物种中不同组织里NAC的生理浓度,研究者得到不同的结果,这可能是因为NAC各亚基生理浓度不同所致<sup>[4]</sup>。

NAC最初被发现可以结合到新生肽链上除信号序列以外的其他序列上。因此,NAC被认为可以阻止肽链的错误定位,其原因是它能阻止SRP结合到无信号的RNCs上。Zhang等<sup>[18]</sup>重新研究了SRP和NAC的相互作用。NAC不影响SRP对无信号RNCs行使功能,但却影响SRP对定位到ER膜上的RNCs行使功能。NAC和SRP同时结合到同一条新生肽链的不同部位上,相互作用促使RNCs定位到ER膜上。

### 1.3 调节新生肽链转位进入线粒体

每时每刻,细胞中成千上万种有着不同生化特性的蛋白都会被从胞质核糖体运送到线粒体上。Beddoe等<sup>[19]</sup>发现,NAC会促使将苹果酸酶的初期多肽高效地运入线粒体内。Georgea等<sup>[20]</sup>发现,缺失NAC的酵母突变体可以正常地翻译多肽,但核糖体却几乎不能与线粒体表面相结合。该酵母突变体虽存在缺陷,但一些蛋白像延胡索酸酶,即便水平下降,但仍能在共翻译过程中正常定位到线粒体。因此,NAC可能会促使核糖体形成一种特定的环境,使

氨基端含有线粒体定位序列的多肽形成最佳构象。

### 1.4 其他重要功能

Whitby和Dixon<sup>[21]</sup>发现,粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*, Sp)的NAC能结合DNA X结,即四通DNA结(four way DNA junctions, DNA Holiday结),该构象的DNA不仅在重组过程中是一个重要的中间体,而且在DNA转录和复制起始过程中起到控制性元件的作用。很多蛋白与X结以一种特定方式结合。有时,这种结合不仅反映出该蛋白对DNA的偏好,也显示出体内X结DNA是该蛋白结合的靶标。SpNAC的每个亚基均能与DNA的Holiday结构结合,但异二聚体形式与DNA结合最佳。通过运用不同的DNA底物形式进行竞争性和结合实验比较,发现SpNAC对X结DNA具有高度选择性。当与SpNAC结合后,X结呈现在它开放的直角构象中,这种与X结的结合受到镁离子浓度的抑制,而镁离子是DNA形成X结所必需的。这表明,SpNAC可以识别X结的构象。此外,即使X结已经与一个四聚体蛋白大肠杆菌的RuvA蛋白结合,SpNAC仍可以与其结合,说明SpNAC仅与X结的一面相互作用。

NAC与抗癌药物阿霉素(adriamycin, ADM)也存在一定的关系<sup>[22]</sup>。阿霉素是一种蒽环类抗肿瘤的抗生素,被用于癌症的化疗中。研究者以出芽酵母作为真核生物模型,发现缺失*BTT1*基因对ADM没有任何影响。当缺失NAC的Egd1p或Egd2p亚基时,ADM的毒性会增强。当缺失NAC和核糖体作用必需的Egd1p的N端时,酵母细胞就会对ADM极其敏感。在该突变酵母中未发现NAC转录活性下降和ADM敏感度之间的关系。因此认为,这种ADM毒性的增强可能是因为核糖体上NAC功能紊乱,而不是核仁功能紊乱所致。

Munz等<sup>[23]</sup>为了解析皮肤损伤修复过程的分子机制,研究了一些受皮肤损伤调控的基因,*skNAC*即为其中之一。该基因在皮肤损伤12 h后开始大量表达。序列同源性分析发现,*skNAC*所表达的蛋白与骨骼肌初期多肽相关复合体(*skNAC*,一种最近被认为是肌肉特异性的转录因子)同源。在受伤时,骨骼肌细胞中*skNAC*特异性地表达。*skNAC*仅在正在分化的和已分化的成肌细胞中表达,正在增殖的未分化的成肌细胞中则不表达。他们首次证明了*skNAC*在肌肉修复过程中的作用。Karan等<sup>[24]</sup>在拟南芥中过表达互花米草(*Spartina alterniflora*)的NAC基因



(称为 $S\alpha\beta$ NAC), 发现该基因可以提高拟南芥对盐和干旱的耐性。

在所有的已测序的古生菌基因组中, 只发现一个基因与NAC基因同源。它能形成一个同源二聚体, 如真核NAC一样也和核糖体有关, 与核糖体上的新生肽链结合。Spreter等<sup>[9]</sup>首次完成了该蛋白的晶体结构检测, 其有两个特点: (1) 一个特有的蛋白折叠结构, 用于介导复合体的二聚化; (2) 一个泛素相关的结构域, 显示出NAC的另一个功能, 通过泛素化调控细胞蛋白质量。

Panasenko等<sup>[25-26]</sup>发现, 酿酒酵母Ccr4-Not复合体控制着EGD复合体的泛素化。EGD复合体的亚基是被泛素化的蛋白, 泛素化位点在细胞生长中受到调控。Egd2p有一个UBA结构域, 该结构域在Egd1p和Egd2p相互作用时不是必需的, 但却是维持这两个蛋白稳定所必需的。Egd1p的泛素化需要Ccr4-Not复合体的一个亚基Not4p(Ccr4-Not复合体共包含9个亚基, 为Not1-5p、Ccr4p、Caf1p、Caf40p和Caf130p), Egd2p泛素化也需要Not4p, 还需要完整的Not4p RING finger结构域以及Ccr-Not复合体的其他亚基。在没有Not4p时, Egd2p会错误地定位到点状结构区(punctuate structures)上。此外, EGD复合体在体外可以被Not4p和Ubc4p(一种E2酶, Not4p可以与其相互作用)泛素化, 说明EGD复合体的泛素化可以被Ccr-Not复合体调控。2008年, Olesya等<sup>[26]</sup>发现, 泛素化对NAC(在酿酒酵母中称为EGD)行使功能起着作用。 $\alpha$ 亚基(Egd2p)上的赖氨酸同时发生突变时, NAC才能去泛素化。 $\beta$ 亚基(Egd1p)只要K29和K30发生突变就能去泛素化; EGD的这两个亚基的泛素化是协同发生的, 先是Egd1p然后是Egd2p。如果Egd1p不能被泛素化, Egd2p就会先被泛素化; 采用突变体研究又发现, EGD泛素化对其本身稳定性以及与核糖体结合是非常关键的; 最后研究EGD/NAC与蛋白酶体的相互作用, 发现Not4p E3连接酶在此相互作用中是EGD/NAC泛素化所必需的。

## 2 NACA与转录调控

1995年, Yotov等<sup>[27]</sup>对人NACA基因进行染色体定位, 发现其位于人12号染色体的12q23-24.1位置上。NACA蛋白由a、b两条肽链组成, 主要在胞质中分布<sup>[11]</sup>。

1997年, Yotov等<sup>[28]</sup>又报道了对小鼠矿化成骨

细胞中一个基因的表达, 称为克隆1.9.2(clone 1.9.2), 该基因是 $\alpha$ NAC(即NACA)的鼠类同源物。 $\alpha$ NAC和克隆1.9.2基因与转录调控蛋白基因序列间具有相似性, 以及与 $\alpha$ NAC蛋白二聚化的对象为转录因子BTF3b, 因此他们推断克隆1.9.2蛋白产物可能具有转录调控功能。通过凝胶阻滞、亲和层析以及蛋白印迹等分析发现,  $\alpha$ NAC/1.9.2与激活子GAL4/VP-16间存在相互作用。 $\alpha$ NAC/1.9.2能被GAL4/VP-16增强10倍。这种增强作用受到基因转录水平的调控, 因 $\alpha$ NAC/1.9.2能增强GAL4/VP-16介导的mRNA的合成, 但不影响GAL4/VP-16的半衰期。而当 $\alpha$ NAC/1.9.2与有转录缺陷的GAL4/VP-16相互作用时,  $\alpha$ NAC/1.9.2蛋白与激活子GAL4/VP-16之间的相互作用就会受到很大程度的影响。同时, 经过免疫沉淀、亲和层析、蛋白印迹等分析发现,  $\alpha$ NAC/1.9.2与TATA框结合蛋白(the TATA binding protein, TBP)间也存在相互作用。由于与 $\alpha$ NAC/1.9.2相互作用的都是辅激活类蛋白, 所以推断 $\alpha$ NAC/1.9.2蛋白是一个转录辅激活子。Moreau等<sup>[29]</sup>研究证实,  $\alpha$ NAC是一个辅激活子, 可以增强c-Jun(激活子蛋白-1, 即AP-1成员之一)所介导的转录。

NACA是一个转录辅激活子, 能增强成骨细胞中AP-1的活性, 在人红白血病细胞系TF-1中扮演细胞调节因子的角色。Lopez等<sup>[30]</sup>研究了NACA在人体造血中的作用, 发现NACA在未分化的TF-1细胞和人脐血源性CD34<sup>+</sup>祖先细胞(human cord blood derived CD34<sup>+</sup> progenitor cells)中表达。在体外实验中发现, 它能在红细胞中表达, 然而却不能在分化的巨核细胞和粒细胞中表达。将NACA在红细胞系表达, 通过siRNA干扰技术检测CD34<sup>+</sup>细胞表面血型糖蛋白A(glycophorin A, GYPA, 一种主要表达在人红细胞及其前体中的唾液糖蛋白)的表达量, 发现NACA的表达显著降低, 因此说明NACA能加快红细胞的分化速度。此外, NACA的异位表达能诱导TF-1细胞的分化, 但不依赖于红细胞生成素。通过RNA干扰下调的NACA能降低这些细胞中红细胞生成素的产生, 并可以降低GPA的产生。这些结果表明, NACA可以正向调控人红细胞的分化。

在已分化的成骨细胞的核仁中, 与DNA结合的 $\alpha$ NAC行使着骨钙素基因转录激活子的作用。Jafarov等<sup>[31]</sup>通过染色质免疫共沉淀-芯片技术(ChIP-chip)分析显示,  $\alpha$ NAC不仅结合骨钙素基因的启动

子,而且也能与成肌素基因启动子结合。而且还发现,在成肌细胞中 $\alpha$ NAC与这两个基因启动子均能结合。尽管这两种基因在骨发生和肌发生中受到不同的调控,但是这些结果阐明了 $\alpha$ NAC在细胞和启动子这两种环境下的特定功能。又运用免疫共沉淀实验发现, $\alpha$ NAC与辅阻遏物HDAC1(histone deacetylase 1)和HDAC3在成骨细胞中能形成复合体。ChIP(Sequential ChIP)证实,HDAC1能被 $\alpha$ NAC招募到骨钙素和成肌素的启动子上。这种与辅阻遏物间的相互作用在前成骨细胞和成肌细胞中能观察到,而当这些细胞分化时,相互作用消失。用HDAC的一种抑制剂处理后能够解除成肌细胞中骨钙素的表达。过表达 $\alpha$ NAC在成肌细胞中可以抑制成肌素的表达和细胞的分化;过表达截去N末端的 $\alpha$ NAC突变体会导致成肌细胞中成肌素的表达以及细胞的分化。且这种突变体不能与HDAC1和HDAC3相互作用。 $\alpha$ NAC通过招募不同的辅阻遏物到相应的靶启动子上对间充质细胞分化时的基因转录起调控作用。

1996年,Yotov等<sup>[32]</sup>通过差别剪接将7.0 Kb的 $\alpha$ NAC的mRNA转变为一个6.0 Kb的富含脯氨酸的 $\alpha$ NAC同型体,命名为 $skNAC$ 。 $skNAC$ 蛋白在肌小管中特异表达,不在成肌细胞中表达。目前已经鉴定出它在DNA上的一个特异性结合位点,并且它可以通过该元件来激活靶蛋白的转录。鼠肌球蛋白的启动子上含有三个已经公认的 $skNAC$ 结合位点,通过这些启动子来激活转录, $skNAC$ 反应元件的位点特异性突变可以终止依赖于 $skNAC$ 的激活反应。在C2C12成肌细胞中过表达 $skNAC$ ,可以致使细胞融合成一个巨大的肌囊。说明 $skNAC$ 在成肌过程中和在成肌细胞融合过程中参与分化调控。Berger等<sup>[33]</sup>发现, $skNAC$ 的表达受p38 MAPK的调控,这在肌细胞生成中起到很重要的作用。此外,通过siRNA来抑制成肌细胞中 $skNAC$ 的表达,能导致肌球蛋白重链(MyHc)错误地并入肌小节中,却对MyHc整个蛋白表达水平没有抑制作用。

为了进一步研究 $skNAC$ 的功能,Li等<sup>[34]</sup>从斑马鱼中分离并表征了该基因。斑马鱼 $skNAC$ 的cDNA不同于 $NACA$ 基因,它还另外包含一个编码815个氨基酸的外显子。通过反义核苷酸技术敲除 $skNAC$ ,使得斑马鱼胚胎不能形成骨骼肌,这种缺陷型的胚胎表现出肌肉不能收缩的表型。而注入对照的寡核

苷酸链时,却没有表现出这种效应。同时,这种缺陷型的胚胎中出现混乱的无组织的粗肌丝和细肌丝。且免疫印迹分析表明,肌球蛋白水平显著降低。这些结果显示, $skNAC$ 在肌细胞分化过程中肌原纤维的组装和行使功能中起到很重要的作用。

FADD蛋白(Fas-associated with death domain protein)是信号转导通路中一个重要的介质因子,可以被肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)受体基因超家族的若干个成员激活。近年来,人们运用一些模型解释了一系列FADD介导的信号事件。借助这些模型人们普遍认为,FADD蛋白在没有受体刺激时不形成低聚物。但Stilo等<sup>[35]</sup>发现,在没有死亡受体(death receptor)存在时,FADD可以与 $\alpha$ NAC结合形成复合体。在TNF与该复合体接触时,FADD/ $NAC$ 复合体就会解体。 $NAC$ 能调节FADD低聚物的构象,并调控它所介导的信号转导。因此推断, $NAC$ 或 $\alpha$ NAC是细胞内调控FADD功能的一个因子。

此外,生物信息学分析发现, $\alpha$ NAC包含一个保守的泛素结合基序(泛素相关结构域,UBA结构域)和一个 $NAC$ 结构域(被认为介导 $NAC$ 复合体的组装)。UBA结构域是一个广泛存在于与泛素-蛋白酶体降解系统相关蛋白上的蛋白模块(protein module)。许多包含UBA结构域的蛋白质被表明能特异地与泛素相互作用,其中有一些能依靠26S的蛋白酶体调节蛋白降解。而另一些则调控着其他细胞途径,最为显著的就是细胞的内吞作用和膜运输<sup>[36]</sup>。 $\alpha$ NAC上UBA结构域的存在表明, $NAC$ 可能在这些细胞途径中也发挥着作用。

为使 $NACA$ 与靶蛋白/靶基因转录调控间的关系更加清晰,特绘制表2加以说明。

### 3 $NACA$ 与临床疾病

#### 3.1 $NACA$ 与细胞异常所引起的疾病的关系

当身体受到外界或者自身抗原刺激时,机体内抗原特异性淋巴细胞可识别抗原(感应),发生活化、增殖和分化,表现出一定的体液免疫和细胞免疫效应。细胞免疫由T细胞来完成。T细胞受到抗原刺激后会增殖、分化、转化为各种具有不同功能的T细胞。T细胞按照功能和表面标志分为细胞毒性T细胞(cytotoxic T cell)、辅助T细胞(helper T cell)、调节/抑制T细胞(regulatory/suppressor T cell)和记忆T细胞(memory T cell)。细胞毒性T细胞的主要表面

表2 NACA与靶蛋白/靶基因转录调控间的关系

Table 2 Transcriptional regulation links of NACA and some target proteins/genes

与NACA互作的转录调控蛋白/基因 Proteins/genes interacted with NACA	转录调控方式 Transcriptional regulation ways
BTF3b	BTF3b is identified as the heterodimerization partner of NACA <sup>[28]</sup> .
GAL4/VP-16	The NACA protein is potentiated by 10-fold the activity of the chimeric activator GAL4/VP-16 at the level of gene transcription <i>in vivo</i> <sup>[28]</sup> .
TBP (TATA box-binding protein)	NACA can interact with TBP <sup>[28]</sup> .
c-Jun (AP-1)	NACA can potentiate c-Jun-mediated transcription <sup>[29]</sup> .
Genes/proteins of TF-1 and human cord blood derived CD34 <sup>+</sup> progenitor cells	NACA is a positive regulator of human erythroid-cell differentiation <sup>[30]</sup> .
HDAC1 and HDAC3	NACA interacts with histone deacetylase corepressors to control Myogenin and Osteocalcin gene expression <sup>[31]</sup> .
skNAC	skNAC is regulated by p38 MAPK <sup>[32-33]</sup> and is required for myofibril organization <sup>[34]</sup> .
FADD	NACA is a factor in regulating FADD function <sup>[35]</sup> .
Ubiquitin	NACA contains a UBA domain specifically interacted with ubiquitin and a NAC domain, which is related with protein degradation, endocytosis and membrane transportation <sup>[36]</sup> .

标志是CD8, 然而调控CD8<sup>+</sup> T细胞增殖分化的分子机制还不是很清楚。为了弄清该机制, Al-Shanti等<sup>[37]</sup>基于 $\alpha$ NAC在人CD8<sup>+</sup> T细胞分化过程中呈下调趋势的情况, 运用反义技术(anti-sense technology), 降低翻译 $\alpha$ NAC的mRNA的浓度后, 发现CD8<sup>+</sup> T细胞在有反义寡核苷酸链存在时, 会更高程度地分化和激活, 而且增殖效应也有所提高。与对照组相比, CD8<sup>+</sup> T细胞对靶细胞的杀伤力增强。研究显示, 抑制 $\alpha$ NAC后, 可以诱导CD8<sup>+</sup> T细胞的增殖分化, 并增强细胞毒性。

Mossabeb等<sup>[38]</sup>发现,  $\alpha$ NAC可以对过敏性皮炎患者有IgE-自身免疫反应。通过寡核苷酸筛选, 他们分离出一个完整的cDNA, 编码一个新的 $\alpha$ NAC亚型。将该基因加上His标签在大肠杆菌中表达, 并经镍柱纯化。圆二色性分析发现, 该重组蛋白 $\alpha$ NAC是一种折叠性的蛋白, 是一种将 $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 折叠与热稳定性以及再折叠能力相结合的蛋白。完整的重组 $\alpha$ NAC(215个氨基酸)及其C末端的86个氨基酸片段都能与IgE自身抗体特异性结合。另外还发现,  $\alpha$ NAC能诱导过敏性皮炎患者的外围血液单核细胞产生特异性淋巴组织增生反应。

此外, Kim等<sup>[39]</sup>发现, 患有老年痴呆症和唐氏综合征的患者脑细胞中, NACA要低于正常水平。

### 3.2 NACA与病毒性疾病的关系

Goatley等<sup>[40]</sup>研究发现, 非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV) j4R蛋白能与 $\alpha$ NAC在靶细胞的质膜附近以及质中相互作用。在病毒复制周期的后期表达, 并且在感染的细胞核和质中均存在。

体外实验表明, j4R与 $\alpha$ NAC的结合不会影响NAC的 $\alpha$ 亚基和 $\beta$ 亚基的异二聚化。

为了弄清楚乙型病毒性肝炎(viral hepatitis type B)的感染机制, Li等<sup>[41]</sup>运用酵母双杂交技术筛选了人类肝细胞内能与PreS1蛋白相互作用的蛋白, 为NACA。运用交合实验、免疫共沉淀等实验证实了这两种蛋白间确实存在相互作用。说明在肝细胞内NACA是HBV(the hepatitis B virus)的PreS1蛋白的一个靶标<sup>[42]</sup>。

Li等<sup>[43]</sup>应用酵母双杂交技术筛选丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)核心蛋白的结合蛋白, 从肝细胞cDNA文库中筛选到一种蛋白可以与HCV核心蛋白结合, 将其命名为HCBP6, 与GenBank中的已知功能蛋白没有显著的同源性, 因此判断其为未知功能的新基因。为了研究HCBP6基因的表达对于肝细胞基因表达谱的影响, Liu等<sup>[44]</sup>构建了HCBP6的真核表达载体, 转染肝母细胞瘤细胞系HepG2后, 利用基因芯片技术对HCBP6蛋白上调和下调的靶基因进行筛选, 发现HCBP6蛋白可以显著上调 $\alpha$ NAC的表达水平。为了进一步证实这一发现, Yang等<sup>[45]</sup>利用生物信息学技术, 分析鉴定了 $\alpha$ NAC的启动子的核苷酸序列, 并构建了 $\alpha$ NAC启动子与报告基因氯霉素乙酰化酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)的表达载体, 证实HCBP6表达载体与报告基因表达载体进行共转染时, HCBP6蛋白可显著提高 $\alpha$ NAC启动子的转录水平。因此判定,  $\alpha$ NAC基因是HCBP6的上调靶基因。

非结构蛋白5A(nonstructural protein 5A, NS5A)是



表3 一些临床疾病与 $\alpha$ NAC的关系Table 3 Links between  $\alpha$ NAC and some clinical diseases

临床疾病	$\alpha$ NAC与一些临床疾病间存在的关系
Clinical diseases	Links between $\alpha$ NAC and clinical diseases
Cellular immunity	Inhibition of $\alpha$ NAC protein induces cell proliferation and differentiation and cytotoxic activity of CD8 <sup>+</sup> T cells <sup>[37]</sup>
Alzheimer's disease and Down syndrome	$\alpha$ NAC is downregulated <sup>[39]</sup>
Allergic dermatitis	$\alpha$ NAC can specifically bind IgE autoantibodies <sup>[38]</sup>
African swine fever	$\alpha$ NAC can bind the African swine fever virus (ASFV) j4R protein <sup>[40]</sup>
Viral hepatitis type B	$\alpha$ NAC can bind the hepatitis B virus (HBV) PreS1 protein <sup>[41-42]</sup>
Viral hepatitis type C	$\alpha$ NAC is up-regulated by hepatitis C virus (HCV) core protein-binding protein 6 <sup>[43-45]</sup> . $\alpha$ NAC is down-regulated by HCV non-structural NS5A protein <sup>[46-50]</sup>

HCV编码的众多非结构蛋白之一,具有反式激活等许多生物学活性,其竣基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸,这是真核细胞转录因子特有的结构特征<sup>[46-48]</sup>。成军等<sup>[49]</sup>和Dai等<sup>[50]</sup>应用基因芯片技术对HCV NS5A蛋白的反式调节靶基因进行筛选,发现HCV NS5A蛋白可以下调NACA基因启动子的转录活性。

一些临床疾病与 $\alpha$ NAC存在的关系总结见表3。

#### 4 总结与展望

NAC作为从核糖体上延伸出来的新生肽链第一个接触的胞质因子,由 $\alpha$ 和 $\beta$ 两个亚基组成。NAC是一种多功能的蛋白,在保护新生肽链、调控新生肽转位进入内质网和线粒体以及肌肉损伤修复等方面有着重要的功能。其 $\alpha$ 亚基,即NACA/ $\alpha$ NAC,主要在转录调控中起作用,如能与辅激活类蛋白相互作用、激活骨钙素基因、正向调控人红细胞分化、调节肌发生、调控FADD等一系列相关的功能。在转录调控过程中,NACA可以调控其他蛋白行使功能,但也会受到一些蛋白的调控,并且有些蛋白调控方式和机理还不清楚。在众多病毒性疾病中,NACA通过与病毒蛋白相互作用致使机体功能紊乱,这将为我们在研究病毒性疾病发病机理时开辟出一条新思路。其 $\beta$ 亚基除了能与核糖体蛋白相互作用外,还可能参与调控细胞凋亡。

Yotov等<sup>[28]</sup>和Moreau等<sup>[29]</sup>在1998年发现,可以作为转录激活子的小鼠 $\alpha$ NAC在 $\beta$ 亚基与其共表达时,这一活性消失。这让我们不得不去思考NAC复合体在细胞内的功能与其两个亚基各自在细胞内功能间的关系,即NAC、 $\alpha$ 以及 $\beta$ 亚基三者功能间的关系。NAC在保护新生肽链时是依靠其 $\beta$ 亚基与核糖体蛋白结合来完成的,这表明,NAC行使这一功能依附于 $\beta$ 亚基。而Whitby等<sup>[21]</sup>发现,SpNAC的 $\alpha$ 、 $\beta$ 亚

基均能与DNA的Holiday结构结合,但其异二聚体形式与DNA结合最佳。当敲除野生型酿酒酵母细胞中NAC/EGD的某一亚基后,其他亚基在生理生长温度下会下调,可见NAC的两个亚基间存在一定的调控关系。这两个亚基的泛素化是协同发生的,先是Egd1p/ $\beta$ 然后是Egd2p/ $\alpha$ 。如果Egd1p不能被泛素化时,Egd2p就会先被泛素化<sup>[12]</sup>,而且EGD泛素化对其本身稳定性以及与核糖体结合有很重要的关系。

NAC、 $\alpha$ 亚基以及 $\beta$ 亚基三者功能间的异同,需要我们进一步去探究。NAC及其 $\alpha$ 亚基 $\alpha$ NAC在临床疾病中所表现出的功能广泛性,启示我们或许可以从NAC或 $\alpha$ NAC出发去探究细胞病理。

#### 参考文献 (References)

- Wiedmann B, Sakai H, Davis TA, Wiedmann M. A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* 1994; 370(6489): 434-40.
- Bukau B, Deuerling E, Pfund C, Craig EA. Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 2000; 101(2): 119-22.
- Grallath S, Schwarz JP, Bottcher UM, Bracher A, Hartl FU, Siegers K. L25 functions as a conserved ribosomal docking site shared by nascent chain-associated complex and signal-recognition particle. *EMBO Rep* 2006; 7(1): 78-84.
- Moeller I, Beatrix B, Kreibich G, Sakai H, Lauring B, Wiedmann M. Unregulated exposure of the ribosomal M-site caused by NAC depletion results in delivery of non-secretory polypeptides to the Sec61 complex. *FEBS Lett* 1998; 441(1): 1-5.
- Rospert S, Dubaquié Y, Gautschi M. Nascent-polypeptide-associated complex. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59(10): 1632-9.
- Deng JM, Behringer RR. An insertional mutation in the BTF3 transcription factor gene leads to an early postimplantation lethality in mice. *Transgenic Res* 1995; 4(4): 264-9.
- Markesich DC, Gajewski KM, Nazimiec ME, Beckingham K. Bicaudal encodes the *Drosophila* beta NAC homolog, a component of the ribosomal translational machinery. *Development* 2000; 127(3): 559-72.
- Kogan GL, Gvozdev VA. Multifunctional nascent polypeptide-associated complex (NAC). *Mol Biol* 2014; 48(2): 189-96.
- Spreter T, Pech M, Beatrix B. The crystal structure of archaeal

- nascent polypeptide-associated complex (NAC) reveals a unique fold and the presence of a ubiquitin-associated domain. *J Biol Chem* 2005; 280(16): 15849-54.
- 10 Beatrix B, Sakai H, Wiedmann M. The  $\alpha$  and  $\beta$  subunit of the nascent polypeptide-associated complex have distinct functions. *J Biol Chem* 2000; 275(48): 37838-45.
- 11 Shi X, Parthun MR, Jaehning JA. The yeast EGD2 gene encodes a homologue of the  $\alpha$ NAC subunit of the human nascent-polypeptide-associated complex. *Gene* 1995; 165(2): 199-202.
- 12 Reimann B, Bradsher J, Franke J, Hartmann E, Wiedmann M, Prehn S, *et al.* Initial characterization of the nascent polypeptide-associated complex in yeast. *Yeast* 1999; 15(5): 397-407.
- 13 Wang S, Sakai H, Wiedmann M. NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions nascent chains just emerging from the peptidyl transferase center. *J Cell Biol* 1995; 130(3): 519-28.
- 14 Lauring B, Kreibich G, Wiedmann M. The intrinsic ability of ribosomes to bind to endoplasmic reticulum membranes is regulated by signal recognition particle and nascent-polypeptide-associated complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(21): 9435-9.
- 15 Lauring B, Sakai H, Wiedmann M. Nascent polypeptide-associated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(12): 5411-5.
- 16 Moëller I, Jung M, Beatrix B, Levy R, Kreibich G, Zimmermann R, *et al.* A general mechanism for regulation of access to the translocon: Competition for a membrane attachment site on ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(23): 13425-30.
- 17 Powers T, Walter P. The nascent polypeptide-associated complex modulates interactions between the signal recognition particle and the ribosome. *Curr Biol* 1996; 6(3): 331-8.
- 18 Zhang Y, Berndt U, Gözl H, Tais A, Oellerer S, Wölfle T. NAC functions as a modulator of SRP during the early steps of protein targeting to the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 2012; 23(16): 3027-40.
- 19 Beddoe T, Lithgow T. Delivery of nascent polypeptides to the mitochondrial surface. *Biochim. Biophys Acta* 2002; 1592(1): 35-9.
- 20 Georgea R, Walsh P, Beddoe T, Lithgow T. The nascent polypeptide-associated complex (NAC) promotes interaction of ribosomes with the mitochondrial surface *in vivo*. *FEBS Lett* 2002; 516(1/2/3): 213-6.
- 21 Whitby MC, Dixon J. Fission Yeast nascent polypeptide-associated complex binds to four-way DNA junctions. *J Mol Biol* 2001; 306(4): 703-16.
- 22 Takahashi T, Naganuma A. Nascent polypeptide-associated complex in ribosomes plays a key role in protection against adriamycin toxicity in budding yeast. *Toxicol Lett* 2010; 196S: S347-S51.
- 23 Munz B, Wiedmann M, Lochmüller H, Werner S. Cloning of novel injury-regulated genes. *J Biol Chem* 1999; 274(19): 13305-10.
- 24 Karan R, Subudhi PK. Overexpression of a nascent polypeptide associated complex gene (Sa $\beta$ NAC) of *Spartina alterniflora* improves tolerance to salinity and drought in transgenic *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 424(4): 747-52.
- 25 Panasenko OO, Landrieux E, Feuermann M, Finka A, Paquet N, Collart MA. The yeast Ccr4-Not complex controls ubiquitination of the nascent-associated polypeptide (NAC-EGD) complex. *J Biol Chem* 2006; 281(42): 31389-98.
- 26 Panasenko OO, David FP, Collart MA. Ribosome association and stability of the nascent polypeptide-associated complex is dependent upon its own ubiquitination. *Genetics* 2008; 181(2): 447-60.
- 27 Yotov WV, St-Arnaud R. Mapping of the human gene for the alpha-NAC/1.9.2 (NACA/1.9.2) transcriptional coactivator to Chromosome 12q23-24.1. *Mamm Genome* 1996; 7(2): 163-9.
- 28 Yotov WV, Moreau A, St-arnaud R. The alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex functions as a transcriptional coactivator. *Mol Cell Biol* 1998; 18(3): 1303-11.
- 29 Moreau A, Yotov WV, Glorieux FH, St-Arnaud R. Bone specific expression of the alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex, a coactivator potentiating c-Jun-mediated transcription. *Mol Cell Biol* 1998; 18(3): 1312-21.
- 30 Lopez S, Stuhl L, Fichelson S, Dubart-Kupperschmitt A, St Arnaud R, Galindo JR, *et al.* NACA is a positive regulator of human erythroid-cell differentiation. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 8): 1595-605.
- 31 Jafarov T, Alexander JW, St-Arnaud R.  $\alpha$ NAC interacts with histone deacetylase corepressors to control Myogenin and Osteocalcin gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1819(11/12): 1208-16.
- 32 Yotov WV, St-Arnaud R. Differential splicing-in of a proline-rich exon converts  $\alpha$ NAC into a muscle-specific transcription factor. *Genes Dev* 1996; 10(14): 1763-72.
- 33 Berger F, Berkholz J, Breustedt T, Ploen D, Munz B. Skeletal muscle-specific variant of nascent polypeptide associated complex alpha (skNAC): Implications for a specific role in mammalian myoblast differentiation. *Eur J Cell Biol* 2012; 91(2): 150-5.
- 34 Li H, Randall WR, Du SJ. skNAC (skeletal Naca), a muscle-specific isoform of Naca (nascent polypeptide-associated complex alpha), is required for myofibril organization. *FASEB J* 1990; 23(6): 1988-2000.
- 35 Stilo R, Liguoro D, di Jeso B, Leonardi A, Vito P. The  $\alpha$ -chain of the nascent polypeptide-associated complex binds to and regulates FADD function. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303(4): 1034-41.
- 36 Andersen KM, Hofmann K, Hartmann-Petersen R. Ubiquitin binding proteins: Similar, but different. *Essays Biochem* 2005; 41: 49-67.
- 37 Al-Shanti N, Aldahoodi Z. Inhibition of alpha nascent polypeptide associated complex protein may induce proliferation, differentiation and enhance the cytotoxic activity of human CD8<sup>+</sup>T cells. *J Clin Immunol* 2006; 26(5): 457-64.
- 38 Mossabeh R, Seiberler S, Mittermann I, Reiningger R, Spitzauer S, Natter S, *et al.* Characterization of a novel isoform of  $\alpha$ -NAC as IgE-defined autoantigen. *J Invest Dermatol* 2002; 119(4): 820-9.
- 39 Kim SH, Ki SS, Lubec G. Human brain nascent polypeptide-associated complex alpha subunit is decreased in patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *J Invest Med* 2002; 50(4): 293-301.
- 40 Goatley LC, Twigg SR, Miskin JE, Monaghan P, St-Arnaud R, Smith GL, *et al.* The African swine fever virus protein j4R binds to the alpha chain of nascent polypeptide-associated complex. *J*



- Virology 2002; 76(19): 9991-9.
- 41 Li D, Wang XZ, Ding J, Yu JP. NACA as a potential cellular target of hepatitis B virus PreS1 protein. *Digest Dis Sci* 2005; 50(6): 1156-60.
- 42 李丹, 丁健, 林纳, 王小众. 乙型肝炎病毒PreS1蛋白与初期多肽相关复合体 $\alpha$ 亚单位特异性结合的研究. 第三军医大学学报(Li Dan, Ding Jian, Lin Na, Wang Xiaozhong. Interaction between Hepatitis B virus PreS1 protein and nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide. *Acta Acad Med Mil Tert* 2009; 31(23): 2315-8.
- 43 Li K, Wang L, Cheng J, Zhang L, Duan H, Lu Y, *et al.* Screening and cloning human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene. *Chin J Exp Clin Virol* 2002; 16(4): 351-3.
- 44 刘妍, 成军, 李克. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. 世界华人消化杂志(Liu Yan, Cheng Jun, Li Ke. Bioinformatics analysis of human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene. *World Chin J Digestol* 2003; 11(4): 378-84.
- 45 Yang Q, Liu Y, Cheng J, Li K, Wang JJ, Hong Y, *et al.* Up-regulating effect of human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 on NACA gene promoter. *World Chin J Digestol* 2003; 11(7): 959-62.
- 46 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 等. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒NS5A抗原模拟表位. 世界华人消化杂志(Zhong Yanwei, Cheng Jun, Chen Xinhua, Wang Gang, Hong Yuan, Wang Lin, *et al.* Epitope mapping of hepatitis C virus NS5A antigen from a peptide phage library by using immobilized specific monoclonal antibody. *World Chin J Digestol* 2002; 10(2): 133-6.
- 47 成军, 钟彦伟, 施双双, 刘妍, 王刚, 董菁, 等. HCV非结构蛋白NS5A人源单链可变区抗体基因的筛选与鉴定. 中华实验与临床病毒学杂志(Cheng Jun, Zhong Yanwei, Shi Shuangshuang, Liu Yan, Wang Gang, Dong Jing, *et al.* Screening and characterization of human phage antibody to hepatitis virus C NS5A antigen. *Chin J Exp Clin Virol* 2001; 15(3): 216-8.
- 48 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式调节基因的研究. 世界华人消化杂志(Hong Yuan, Liu Yan, Cheng Jun, Yang Qian, Wang Jianjun. Genes trans-regulated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus with microarray assay. *World Chin J Digestol* 2003; 11(7): 939-42.
- 49 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 等. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活基因10的克隆化研究. 世界华人消化杂志(Cheng Jun, Liu Yan, Hong Yuan, Wang Lin, Zhong Yanwei, Dong Jing, *et al.* Identification and characterization of gene 10 transactivated by hepatitis C virus on-structure protein 5A with DNA microarray assay. *World Chin J Digestol* 2003; 11(7): 935-8.
- 50 Dai JZ, Cheng J, Qu JH, Ji D. Study of down-regulating effect of Hepatitis C virus NS5A protein on NACA promoter. *Chin J Hepatol* 2005; 13(8): 579-81.