

生肌螺旋-环-螺旋蛋白*

肖国芝 贾弘提 张迺衡

(北京医科大学生化教研室, 北京 100083)

提 要

HLH 蛋白是近几年来发现的一类 DNA 结合蛋白, 其分子中含有一螺旋-环-螺旋 (HLH) 结构. 至今, 其家族成员已超过 20 个, 它们参与转录调节、细胞癌变以及细胞分化等过程. 骨骼肌发育成熟的各个阶段均受到特异生肌转录调节蛋白因子的控制. 这些因子包括 Myo D1, myogenin 以及 Myf-5 等, 它们均系 HLH 家族成员, 在生肌过程中起非常重要作用.

关键词 生肌作用, 螺旋-环-螺旋结构, 转录激活作用, 顺式作用元件

胚胎时期骨骼肌组织自发生至成熟经由下列阶段: 纤维母细胞 (fibroblast) 的生成; 纤维母细胞转变为生肌细胞 (myoblast); 生肌细胞分化为肌小管 (myotube), 后者进而融合成为多核的肌纤维. 螺旋-环-螺旋 (helix-loop-helix, HLH) 是近年来发现的 DNA 结合蛋白中负责结合 DNA 和形成二聚体的结构. HLH 蛋白家族成员正与日增多, 目前已超过 20 种 (图 1)^[1]. HLH 蛋白参与转录调节、细胞癌变以及

细胞分化等过程. 果蝇中, AC-S 调节神经分化, twist 在胚层发生中起作用, daughtless (da) 涉及神经发育和性别决定, hairy 与分节和刚毛类型有关. HLH 结构也存在于某些增强子结合蛋白诸如 E12, E47 (E2A 基因产物) 中. 本文旨在介绍在骨骼肌生成过程中起重要作用的几种 HLH 蛋白, 即 Myo D1, myogenin 以及 Myf-5.

```

Ly1-1  ARRVFTNSRERWRQQNVNGAFaelrKLLPThP-----PDRKLSKNEVLRlAMKYIGFLVRL
SCL    VRRIFTNSRERWRQQNVNGAFaelrKLLPThP-----PDKKLSKNEILrLAMKYINrLAKL
E12    ERRVANNARERLRVDINEAFKELGRMCLHLNSEKP-----QTKLLILHqAVSVILNLEqq
c-myc  VKRrTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIP-----ELEN-----NEKAPKVViLKkATAYiLSVqAE
L-myc  TKRKNHNiLERKRRNDLRsRFLALRDQVP-----TLAS-----CSKAPKVViLSKALEYlQALVGA
N-myc  EERRNHNiLERQRRNDLRsSFLRLRDHVP-----ELVK-----NEKAAKVViLKkATEYiVHSLqAE
MAX    DKRAHHNAlERKRRDHikDSFHSiLRDSVP-----SLQG-----QKASRAQiLDKATEYiQYMRrk
MyoD   DRKKAATMRERRRlSKVNEAFETlKRCTSSNP-----NQRlPKVeiLRNAiRYiEGLqAL
twist  NQRVMANVRERQRtQSLNDaFkSLQqIIP-----TL-----PSDKLSKiQTLKlATRYiDPLCRm
da     ERRQANNARERiRiRDINEAlKELGRMCMThLKSdKP-----QTKLGiLNMAVEYiMTLEqq
AC-S T4 QRR---NARERNRVKqVNNsFARlRQHIPqSiITDLTKG--G-GRGPHKKiSKVDtRiAVEYiRSLQdL
Lc     TGtKNHVMSErKRRREKLNEMFVLKSLlPSiHR-----VNKAiSLAEtIAYlKELQRR
CBF-1  QRKDSHKEVERRRRENiNTAiNVLSDLiT-----VR-----E-SSKAiLARAaEYiQKLKET
AP-4   iRREiANSNERRRMQSiNAGFQSLKtLiP-----HTDG-----EKLSKAiLQQTAEYiFSLEqE
USF    KRRaQHNEVERRRDKiNNNiVQLSKiIP-----DCSMESTKSGQS-----KGGiLSKACDyiQELRqS
hairy  DRRSNKPiMEKRRRRiNNCLNELKtLiL---DATKKDPA---RHSKLEKADiLEKtVKHLQELQRq
Id     LPALLDEqQVNVLLYDMNGCYsRLKELVP-----TLP-----QNRKVSKEViLQHViDYiDLQLLE
emc    RiQRHPTHRGDGENAEKMYLSKLKDLVP-----FMP-----KNRKLTKLEiIQHViDYiCDLQTE
E (spl) m8 YQKVKKPMLEQRQRARMNRCLDNlKTLVA-----ELRGDDG-----iLRMDKaEMLESaViFMRRQqKTP

```

碱性区 螺旋 1 环 螺旋 2

图 1 典型 HLH 蛋白的部分氨基酸序列比较

黑点下面为高度保守的氨基酸残基. 图中显示 HLH 区和其上游碱性区.

Id, hairy, emc 及 E (spl) m8 蛋白中的碱性区被破坏或缺乏

1 生肌 HLH 蛋白的结构特点

1987年, Davis 及其同事^[2]首次用生肌细胞 cDNA 与纤维母细胞 C3H10T1/2 的 mRNA 进行缩减杂交 (subtractive hybridization) 制备探针, 用这些探针从肌细胞 (myoblast) 的 cDNA 文库中探得一些阳性克隆, 他们发现其中之一转染 C3H10T1/2 后, 后者以高频 (53%) 转变为稳定的生肌细胞. 他们将此 DNA 命名为生肌细胞决定基因 (myoblast determination gene number 1, 简称 Myo D1). 根据其核苷酸序列推导出它所编码的蛋白质的氨基酸序列, 并将此蛋白质称为 Myo D1 蛋白或 Myo D1. 现已知它是细胞核中的一种 DNA 结合蛋白, 属于磷蛋白. 小鼠的 Myo D1 由 318 个氨基酸残基组成, 它由几个结构域组成 (图 2). 其中酸性区 (1—60) 含较多酸性氨基酸; 碱性区 (102—121) 序列呈高度保守, 且富含碱性氨基酸 (Lys 和 Arg); 紧邻碱性区之后 (121—162) 有一螺旋-环-螺旋结构^[3].

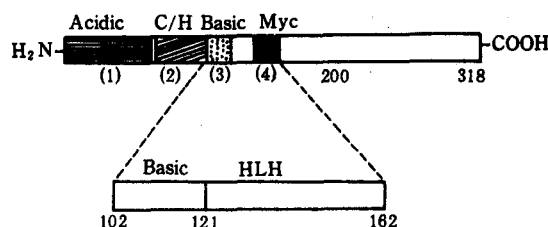


图 2 小鼠 Myo D1 的结构特点

- (1) 氨基端 (1—60), 含较多酸性氨基酸残基
- (2) C/H 区 (62—101), 含较多半胱氨酸 (Cys) 和组氨酸 (His) 残基
- (3) Myc 区 (141—162), 与 c-myc 基因同源
- 第 121 至 162 残基组成一螺旋-环-螺旋结构.
- 羧基端从 163 至 318 残基

Wright 等 (1989)^[4]在大鼠 L6 生肌细胞中发现了另一种生肌转录调节蛋白——myogenin, 它由 237 个氨基酸残基组成, 分子量为 32.5kD, 属于核 DNA 结合蛋白. 它与其它 HLH 蛋白的氨基酸顺序之间存在同源性. 它与果蝇的 AC-S 蛋白之间的同源性只限于双方的 c-myc 区, 而与 Myo D1 之间的同源性则更为

Myogenin	MELYSPTSPYFYQEPHFYDGENYLPVHLQGFEPFG	34
MyoD1	MELLSPLLRDIDLTPDGLSCSPETADDFYDDPCFDSPLRFFEDLDPRLVHVHGALLKPE	60
	YERTELSLSPEARGLPEEKGLGTP EHCPCQCLPWACKVCKRKSVSVDERRAATLREKR	92
	EHAHPSTAVHFGPAREDEHVRAPSGHHQAGRCILWACKACKRKTNNADRRKAATMRER	120
	RLKKVNEAFELKRSTLLNPNQRLPKVEILRSATQYIERLQALLSSLNQEERDL	146
	RLSKVNEAFETLKRCTSSNPNQRLPKVEILRNARIYIEGLQALLRDQDAAPGAAAFYAP	180
	RYRGQGGPSRWYPVNATPTAPPVRSQAMHWSLVPTQEIIICSQTLTLQVPTTCTPLRPSW	206
	GPLPFGRGSEHYSGDSASSPRNSCDGMDYSGPPSGP RRQNGYDTAYVSEAVRESR	238
	TASRWRICLSPSQMKPCPTEIVCQAGCAWEPLSWCQTPPLLQGGPFKWCPCGAQKTALGC	266
	PGK SAAVSSLDCLSSIVERISTDSAPAALLADAPPESPPGPEGASLSDTEQGTQT	296
	HKPDYPPSIHIRTLPSPAREFN	287
	PSPDAAPQCPAGSNPNAIYQVL	318

图 3 Myogenin 与 Myo D1 氨基酸序列比较

|: 相同氨基酸残基 : : 保守氨基酸残基改变 —: myc 同源区 |||||, his/cys 富含区 . — .: 碱性区

广泛: 碱性区和 c-myc (81—136) 同源性最高 (91%), N 端 (1—60) 也存在显著的同源性, 但两者羧基端的同源性低 (图 3). 此外, myogenin 中含一可能的亮氨酸拉链 (leucine zipper) 结构, 此结构开始于第 132 氨基酸残基, Myo D1 中无此结构.

Braun 等 (1989)^[5]利用小鼠 Myo D1 DNA 作为探针, 从人胚胎骨骼肌细胞的 cDNA 文库中找到一个克隆, 它编码一种新的生肌因子——Myf-5, 它由 255 个氨基酸残基组成, 比小鼠 Myo D1 短 63 个氨基酸残基. Myf-5 中第 51—141, 157—167 及 202—216 三段序列分别

与 Myo D1 中第 77—166, 199—209 及 246—260 区高度同源, 其中包括碱性区和 C-myc 区. 两者氨基端的同源性差. 其氨基端富含酸性氨

基酸 (约 30%). 其碱性区也包含螺旋 1 和环结构, 螺旋 2 存在于 c-myc 区, 这与 Myo D1 不同^[6] (图 4).

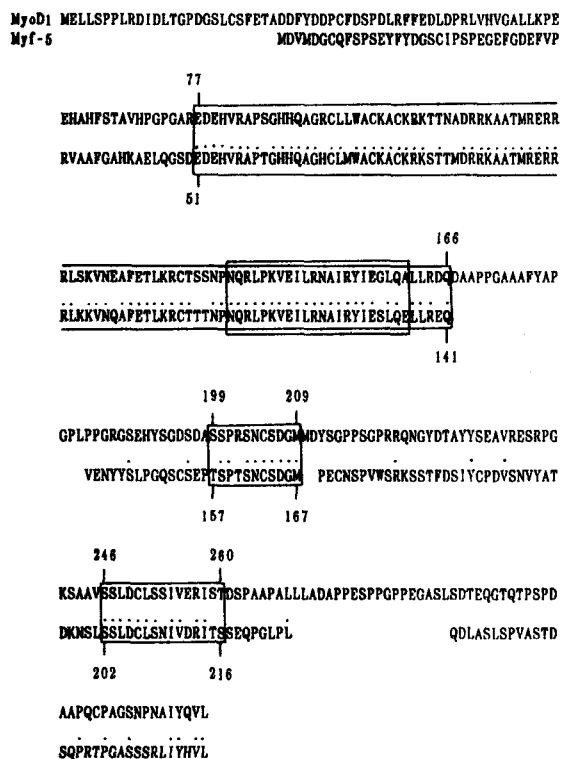


图 4 Myf-5 与 Myo D1 氨基酸序列比较

黑点上下是相同的氨基酸残基; 双线框内为两者的 myc 同源区

2 生肌 HLH 蛋白的作用

Myo D1 DNA 转染 C3H10T1/2 后, 后者转变为稳定的生肌细胞, 此时若去除培养基中的血清, 生肌细胞便自动形成肌小管, 最终融合成多核肌纤维^[2]. 与此同时, 许多肌肉特异基因如 α -肌动蛋白 (α -actin)、肌肉肌酸激酶 (muscle creatine kinase, MCK)、肌球蛋白轻链 (myosin light chain, MLC)、肌钙蛋白 (troponin, Tn)、乙酰胆碱受体 (acetylcholine receptor, AChR) 以及某些离子通道 (ion channel) 蛋白等的基因被激活^[7,8]. 此外, Myo D1 DNA 转染一些非生肌细胞诸如脂肪细胞、某些神经细胞以及某些色素细胞等后, 也能激

活这些细胞中肌肉特异基因^[9].

Myogenin 和 Myf-5 的 DNA 转染 C3H10T1/2 后, 均能使后者转变为生肌细胞, 同时激活其中的肌肉特异基因^[5,10].

3 生肌 HLH 的可能作用机制

现已证明, Myo D1 和 myogenin 是通过与被激活基因的顺式作用元件 (cis-acting element) 相互作用而激活相应基因的^[9,11,12]. 许多能被 Myo D1 或 myogenin 激活的基因如 MCK, AChR 的 α , γ , δ 亚基等基因的顺式作用元件中均含有一特定核苷酸序列: CANNTG (称为“E”盒, 其中 N 代表任一核苷酸). Myo D1 和 myogenin 均可与此序列结合并由此激

活下游的相应基因^[13-16]。两者需与自身或其它 HLH 蛋白(如 E12 等)形成同或异二聚体(homodimer, heterodimer)才能结合“E”盒,并激活相应基因^[17]。HLH 结构介导二聚体的形成。碱性区负责激活特异基因。Davis 等将 Myo D1 的碱性区代之以 E12 蛋白的碱性区,发现这种新的蛋白仍能结合 DNA,但结合后不能激活肌肉特异基因^[17]。其它实验室进行的大量碱性区突变研究都证明,碱性区负责激活特异基因^[18]。碱性区作用于“E”盒,定点突变研究表明,改变“E”盒中的碱基可消除它们的激活作用^[12]。碱性区如何激活特异基因,其详细机理尚不完全明了。现知不同生物来源的 Myo D1 的碱性区中均含一高度保守的氨基酸序列: Glu-Arg-X-Arg 或 Glu-Lys-X-Arg (其中 X 代表任一氨基酸残基)。Davis 等认为 Myo D1 形成二聚体后,依靠其中的这两个碱性保守序列中的氨基酸残基分别与 CANNTG 中的 CA 和 TG 相互作用而激活相应基因。Weintraub 等^[22]证明, Myo D1 需协同地同时与靶 DNA 中的两个 CANNTG 结合才能激活相应基因,此种协调性结合由 Myo D1 分子中氨基端约 60 个氨基酸残基介导。删除氨基端的部分残基(3—56)的 Myo D1 蛋白只结合一个 CANNTG 序列,不能同时协调地结合两个部位,结合后不能激活相应基因。他们还证明,只含一个 CANNTG 序列的报告基因能与 Myo D1 结合,但不能被它所激活。Myo D1 分子的羧基端的 160 个残基似乎不重要。

Myf-5 象 Myo D1 和 myogenin 一样,也需与 E12 等形成异二聚体才能结合特异 DNA 并激活肌肉特异基因,但有研究表明,它的转录激活中心不是 bHLH 区,而是位于分子的羧基端^[6]。其详细作用机制尚有待研究。

“E”盒既存在于肌肉特异基因的增强子中,也存在于许多其它如免疫球蛋白、胰岛素等基因的增强子中,而且许多其它广泛或特异组织表达的 HLH 蛋白(如 E12, E47 等)也能结合“E”盒,那么, Myo D1 为什么只激活肌肉特异基因? 为什么肌肉特异基因只能被 Myo

D1 等生肌转录调节因子激活? 例如 Myo D1 和 AC-S 蛋白均属 bHLH 蛋白,两者都能结合“E”盒,可前者激活肌肉特异基因起生肌作用,后者激活神经特异基因,与神经发生过程有关。一种解释是,这种差别一方面是因为 Myo D1 和 AC-S 蛋白的碱性区不同所致,另一方面是不同基因增强子中的“E”盒中 CA 与 TG 之间和两边的序列不同,可能产生差别^[16]。

4 生肌 HLH 蛋白的表达及其控制

目前已知, Myo D1, myogenin 及 Myf-5 主要在骨骼肌或其前身细胞中表达,在心肌和平滑肌中不表达^[4,7,20,21]。目前尚不知在生肌过程中,什么因素最先导致这些生肌蛋白基因的表达。Myo D1 能激活其自身基因的表达,故 Myo D1 表达一旦启动,便能以正反馈方式加以维持,从而使骨骼肌中特异基因的表达得以维持^[22]。Myogenin 和 Myf-5 的情况与 Myo D1 相似^[5,22]。此外,这些因子可以互相促进对方基因的表达,例如, Myo D1 可以促进 myogenin 基因表达, Myogenin 可促进 Myo D1 基因的表达。因此,它们之中只要有一个表达,其它基因也能被激活,这样,它们可能组成正反馈调控网络,负责骨骼肌的生成和维持过程。在肌节中, Myogenin 比 Myo D1 早 2 天开始表达,说明 myogenin 的作用虽与 Myo D1 有一定关系,但它不依赖 Myo D1;同时也说明这些因子可能分别在生肌过程的不同时期起作用^[4]。

另一方面,已经表达的生肌 HLH 蛋白是否能激活肌肉特异基因,并实现生肌过程,还与它们所在细胞中存在的其它因子有关。Weintraub 实验室^[23]从一种不能被 Myo D1 诱导生肌的细胞株(MEL)中鉴定出一种蛋白质,也属于 HLH 家族成员,它与生肌 HLH 蛋白比较,缺乏碱性区。因它能抑制 Myo D1 与特异 DNA 的结合及其后的激活作用,故将其命名为 Id (Inhibitor of DNA binding) 蛋白, Id 蛋白可与 Myo D1 形成异二聚体,但此异二聚体中缺少一个碱性区,故无激活功能,它可能是生肌 HLH 蛋白的一种负性调节因子(图 5)。当有

高水平的有丝分裂原存在时, 转染 myogenin cDNA 的 10T1/2 细胞, 虽然表达 myogenin, 但不表达肌肉特异基因, 说明 myogenin 的作用受到有丝分裂原的抑制^[10].

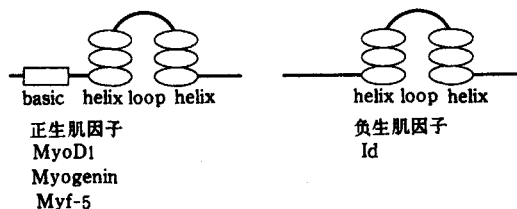


图5 正、负生肌因子

正生肌因子的 HLH 区上游有一碱性区;
负生肌因子 HLH 区上游无相应的碱性区

5 其它生肌 HLH 蛋白

除 Myo D1, myogenin 和 Myf-5 外, MRF-4^[24] 和 myd^[25] 也属于生肌 HLH 蛋白, 它们在结构和功能方面与前三者有许多相似之处.

参 考 文 献

- 1 Visvader J, Begley C G. Helix-loop-helix genes translocated in lymphoid leukemia. *TIBS*, 1991; **16** (9): 330
- 2 Davis R L, Weitraub H, Lassar A B. Expression of a single transfected cDNA convert fibroblasts to myoblasts. *Cell*, 1987; **51**: 987
- 3 Sorrentino V, Peperkok RL, Davis W. Cell proliferation inhibited by Myo D1 independently of myogenic differentiation. *Nature* 1990; **345**: 813
- 4 Wright W E, Sassoon D A, Lin V K *et al.* Myogenin, a factor regulating myogenesis has a domain homologous to Myo D1, *Cell*; 1989; **56**: 607
- 5 Braun T, Bober E, Buschhausen-Denker G *et al.* A novel human muscle factor related to but distinct from Myo D induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J*, 1989; **8**: 701
- 6 Braun T, Winter B, Bober E *et al.* Transcription activation domain of the muscle-specific gene-regulatory protein myf-5. *Nature*, 1990; **346**: 663
- 7 Eftimie R. Myogenin and Myo D1 join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; **88**: 1349
- 8 Yutzy K E, Rhodes S J, Konieczny S F. Differential trans-activation associated with the muscle regulatory factors Myo D1, myogenin and MRF4. *Mol Cell Biol*, 1989; **10**: 3934
- 9 Lassar A B, Buskin J N, Lockshon D *et al.* Myo D1 is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell*, 1989; **58**: 823
- 10 Edmondson D G, Rhodes S J, Konieczny S F. A gene with homology to the myc similarity region of Myo D1 is expressed during myogenesis and sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev*, 1989; **3**: 628
- 11 Buskin J N, Hauschka S D. Identification of a myocyte-specific nuclear factor which binds to the muscle-specific enhancer of the mouse creatine kinase gene. *Mol Cell Biol*, 1988; **9**: 2627
- 12 Brennan T J, Olson E N. Myogenin resides in the nucleus and acquires high affinity for a conserved enhancer element on heterodimerization. *Genes Dev*, 1990; **4**: 582
- 13 Braun T, Bober B, Winter B *et al.* Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: Evidence for a gene cluster on chromosome 12. *EMBO J*. 1990; **9**: 821
- 14 Baldwin T J, Burden S J. Muscle-specific gene expression controlled by a regulatory element lacking a Myo D1-binding site. *Nature*, 1989; **341**: 716
- 15 Sternberg E A, Spizz M E, Perry D *et al.* Identification of upstream and intragenic regulatory element that confer cell-type-restricted and differentiation-specific expression on the muscle creatine kinase gene. *Mol Cell Biol*, 1988; **8**: 2896
- 16 Blackwell T K, Weitraub H. Differences and similarities in DNA-binding preferences of Myo D and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science*. 1990; **250**: 1104
- 17 Davis R L, Cheng P F, Lassar A B *et al.* The Myo D DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell*, 1990; **60**: 733
- 18 Voronova A, Baltimore D. Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**: 4722
- 19 Weintraub H, Davis R, Lockshon D *et al.* Myo D binds cooperatively to two sites in a target enhancer sequence; Occupancy of two sites is required for activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**: 5623
- 20 Clark T G, Morris J Akamatsu M *et al.* A bovine homology to the human myogenic determination factor myf-5; sequence conservation and 3' processing of transcripts. *Nucleic Acids Res*, 1990; **18** (11): 3147

- 21 Sasson D, Lyons G, Wright WE *et al.* Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and Myo D1 during Mouse embryogenesis. *Nature*, 1989; **341**: 303
- 22 Thayer M J, Tapscott S J, Davis R L *et al.* Positive autoregulation of the myogenic determination gene Myo D1. *Cell*. 1989; **58**: 241
- 23 Benezra R, Davis R L, Lockshon D *et al.* The protein Id, A negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*. 1990; **61**: 49
- 24 Rhodes S J, Konieczny S F. Identification of MRF4, A new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev.* 1989; **3**: 2050
- 25 Pinney D F, Pearson-Write SH, konieczny S F *et al.* Myogenic lineage determination and differentiation, Evidence for a regulatory gene pathway. *Cell*, 1988; **53**: 781

神经递质—— γ -氨基丁酸的组织化学*

李俊凤 吴奇久

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

提 要

GABA 是一种分子量极小的氨基酸。GABA 及其合成酶 GAD 主要存在于中枢神经系统中, 是一种独特的抑制性神经递质, 在神经信息加工中起重要作用。近几年来, 对于 GABA 作用的研究越来越引起人们的重视, 分别在生理学药理学、生物化学和组织化学等领域中进行了广泛地探讨。文中介绍了 GABA 的三种组织化学研究途径及其研究结果。

关键词 神经递质, γ -氨基丁酸 (GABA), GABA 抗体, 中间神经元

γ -氨基丁酸 (GABA) 及其合成酶 L-谷氨酸脱羧酶 (GAD) 主要存在于中枢神经系统 (CNS), 在其它的脏器中尚未发现^[1]。GABA 的这种特异存在部位引起科学工作者的浓厚兴趣并进行了不懈的探索。大量地研究表明, GABA 主要由谷氨酸脱羧而来, 其脱羧酶是 GAD。

50 年代后期, Bazemore 和 Eliot 报道了甲壳动物的舒张肌感受器的脉冲因 GABA 的存在而受到抑制^[2]。这一报道给 GABA 的研究开辟了一条新路。后来许多研究者从各个角度对 GABA 的生理作用进行了更深入的探讨, 证明 GABA 的确是一种抑制性神经递质, 最近有人对 GABA 的作用机制作了进一步研究, 证明 GABA 的抑制作用主要是由于细胞体的膜电位超极化而产生的。同时, GABA 有时可通过抑制某些核团, 使某些受这些核团调控的部位解除抑制而促进信息的传递^[3-5]。GABA 的这

些特性及作用机制大部分是以生理学、药理学和生物化学方法证明的, 而 GABA 在 CNS 中的分布及 GABA 神经元纤维的投射关系主要是用³H-GABA 摄取试验法、合成酶放射免疫分析法 (RIA) 和免疫组织化学法证明的, 其中免疫组化法和酶组化法起了最重要的作用。本文重点介绍三种 GABA 检查法及其优缺点, 以及如何将它们互相搭配, 从而比较全面地对该种递质进行研究。近十年来, 由于 GABA 抗体的出现, 使 GABA 的研究取得了迅速发展, 做出了不少出色成果, 在此一并加以简略介绍。

1 GABA 的研究方法

1.1 GAD 免疫组织化学方法

神经递质是以其合成酶或水解酶作为指标

* 中国科学院“七五”重大项目。

收稿日期: 1992-01-23; 修回日期: 1992-12-14