

综述与专论

真核转录因子 TFIIID 研究进展

王 军 贾弘提

(北京医科大学生物化学教研室, 北京 100083)

提 要

结合转录因子 TFIIID 结构与功能, 论述了 RNA 聚合酶 II 是如何从一个特异基因的转录起始点启动转录的。转录因子 TFIIID 是一种序列特异的 DNA 结合蛋白因子, 它首先与含 TATA 的启动子形成前起始复合物, 后者指导 RNA 聚合酶 II 和其它基本转录因子最终组装成转录起始复合物。很多转录激活因子均通过与 TFIIID 相互作用, 控制转录起始复合物的组装或影响其稳定性, 调节基因转录。因此, TFIIID 是一种极其重要的基本转录因子。

关键词 转录因子 TFIIID, 起始复合物, 转录激活

真核生物 mRNA 转录起始是一个复杂的过程。该过程除 RNA 聚合酶 II 外, 还需要一系列基本起始因子 (general initiation factors) 参与。对于具有 TATA 盒子的启动子来说, 已确认参与其转录起始的基本起始因子至少有 TFIIA, TFIIB, TFIIID, TFIIE, TFIIF 等 5 种。其中, TFIIID 是唯一具有与位点特异的 DNA 结合能力的因子。一方面, TFIIID 能识别 TATA 元件并与之特异性结合, 形成 TFIIID-启动子复合物, 后者进而指导 RNA 聚合酶 II 和其它基本起始因子与启动子的有序装配, 最后形成一个稳定的起始复合物。另一方面, 很多重要的转录调节因子均以 TFIIID 为靶分子, 通过与其相互作用, 影响起始复合物的形成或稳定性, 实现对转录的调节。因此, TFIIID 被认为是转录起始中最重要的基本起始因子。

1 TFIIID 的结构

1979 年 Weil 等证明, 有 RNA 聚合酶 II 存在时, 人 KBS-100 细胞的可溶性抽提物可激活腺病毒的主要晚期启动子 (AdML) 的体外转录起始。1980 年 Matsui 等利用层析法将抽提物

分为 4 个组分, 其中之一被命名为 TFIIID。最近研究表明, TFIIID 是由 TATA 结合蛋白 (TBP) 与 TATA 结合蛋白相关因子 (TAFs) 紧密结合形成的复合物。果蝇的 TAFs 至少由分子量为 32, 40, 60, 110, 150kD 的不同多肽链组成。而哺乳类动物的 TAFs 大约由 10—200kD 的 10 种多肽链组成。由于分离纯化困难, 对 TAFs 的研究仍有待深入。

编码 TBP 的 cDNA 已从植物、酵母、昆虫、哺乳类动物等不同物种细胞中克隆成功。根据 cDNA 演绎的 TBP 多肽链结构, 如图 1 所示: TBP C 末端是一个长约 180 个氨基酸的核心区, 该区氨基酸组成具有高度保守性, 各物种间同源性为 80%—90%; 而 N 末端无论在长

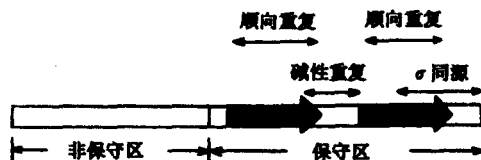


图 1 TBP 的结构模式

度、氨基酸组成和序列上均表现较大差异。如植物 *Arabidopsis thaliana* 的 TBP N 末端只有 18 个氨基酸残基, 而人的却多达 159 个。TBP 的 C 端核心区包括 3 个结构单元: a. 两个间断的 66—67 个氨基酸的顺向重复序列。在酵母中为 67—131 位和 157—222 位。二者间同源性达 40%, 它们可能与 TBP 的折叠有关, 该区还包括一段螺旋-环-螺旋 (HLH) 结构, HLH 结构与蛋白质-蛋白质之间的相互作用有关。b. 中央碱性重复区。位于两段顺向重复序列之间, 富含赖氨酸。有人推测该区可与 DNA 直接作用, 其正电荷被 DNA 的酸性磷酸根中和后, 碱性重复区可形成稳定的 α -螺旋结构。但定点突变表明该区并不与 DNA 的结合直接相关。因此, 有人认为该碱性重复区参与酸性激活物有关的转录激活过程^[1]。对腺病毒 E1A 蛋白的研究证实了这一假设。E1A 与 TBP C 端的 51 个氨基酸 (221—271) 区域结合, 其中就包含碱性重复区^[2]。c. σ 同源区。即一段与细菌 σ 因子序列部分相似的区域, 包含三个重要位点。一经单个点突变则使 TFIIID 丧失结合 DNA 的能力^[3]。 σ 因子识别真细菌属启动子的 -10 区域 (对 σ^{70} (对来说为 TATAAT)。因而真核 σ 同源区被认为是原核 σ 因子识别启动子功能进化上的保留, 而原核 σ 因子的其它功能在真核则分别由其它基本转录因子承担。

2 TFIIID 的功能特点

真核生物 TFIIID 功能是高度保守的。体外转录证明, 酵母和人的 TFIIID 在功能上可以互相代替。两种进化上相距较远的酵母 (啤酒酵母和稷酒裂殖酵母) 的 TFIIID 功能也可以互换。这些研究结果与各物种 TBP C 端核心区的保守性是一致的。体外研究证明, TBP C 端核心区对于 TBP 与 TATA 元件的结合和基本转录是必要的和充分的^[4]。最近 Cormack 等的实验也证明了 C 端核心区在酵母细胞中对于 TFIIID 的主要功能也是必要和充分的^[3,5,6]。

真核生物 TFIIID 功能另一特点是种属特异性。生化实验证明, 酵母 TFIIID 不能对 SP1 激

活物起反应, 而人和果蝇的 TFIIID 则可以^[7]。并且人 TBP 的特定 N 端区对于 SP1 和 GAL-VP16 因子的激活是必需的^[8]。更直接的证据是, 人的 TFIIID 在酵母体内不能行使其主要功能以维持酵母细胞的生长。上述事实提示 TFIIID 功能具有严格的种属特异性。这种种属特异性是由 C 端核心区的差异决定的^[5,6]。关于 TAFs 在其中所起的作用目前知之甚少。

3 TFIIID 与 DNA 的相互作用

TFIIID 对含 TATA 元件的启动子有特异的结合能力, 比任意序列的 DNA 结合力高出 10^5 倍以上。TFIIID 与 DNA 的结合, 不同于一般的 DNA 结合蛋白 (DBP): a. TFIIID 与 TATA 元件的结合和解离相当缓慢, 结合过程需要较高的温度。TFIIID 与单链 DNA 亲和力较高^[9]。b. 与绝大多数 DBP 不同, TFIIID 以单体形式结合 DNA^[10], 并在结合时发生构象变化^[4]。c. 最适宜的结合并不局限于符合天然 TATA 序列的单一 DNA 靶位点。虽然体内和体外实验中, 几乎所有典型 TATA 序列的突变都显著地降低 TFIIID 的功能, 但许多非同源序列也能与 TFIIID 有效地结合^[9]。d. TFIIID 与 DNA 的结合区不象其它转录因子那样定位于一段狭窄的区域 (60—100 个氨基酸), 相反, C 端 180 个氨基酸的任何微小变化均会消除 TFIIID 与 DNA 结合的能力^[10]。这表明整个 C 端核心区的结构完整性对 TFIIID 与 DNA 的结合是至关重要的。e. 与其它 DBP 在 DNA 双螺旋的大沟处结合不同, TFIIID 是在小沟处与 TATA 元件结合。这一观点最早由 Starr 等证实^[11]。他们用 C 和 I 分别置换 T 和 A, 将同源序列 TATAAAA 变为 CICIHI。这一置换改变了大沟的表面, 而不影响小沟。结果未发现 TFIIID 与这一序列的结合与野生型 TATA 盒子有任何差别, 从而间接地证实了 TFIIID 主要与小沟相互作用。Lee 等采用甲基化干扰和羟自由基足迹分析 (hydroxyl radical footprinting assay) 也得到同样结论^[12]。

TBP 与 DNA 结合过程中, TBP 各结构单

元作用如何?对 TBP 和两种原核生物蛋白——整合宿主因子 (IHF) 和 HU 蛋白的比较研究发现, TBP 的两段顺向重复序列与 IHF/HU 的结构具有同源性^[13]. HU 蛋白的 X 线衍射分析显示, 每一亚基具有一个反向平行的双链 β 片层形成的伸展“手臂”. 除 TBP 外, IHF 是已发现的既能识别特异的 DNA 序列又与 DNA 小沟结合的唯一的蛋白. 一般认为, IHF 的二聚体形成两只“手臂”去抓住小沟. 因而推测 TBP 的两段顺向重复的亚区也可能形成两只伸展的“手臂”去抓住小沟. 尽管 TBP 结合 DNA 时, 各结构单元所起的作用尚不十分清楚, 然而已有实验证明: TFIIID 的 N 端非保守区对 DNA 结合无关紧要, C 端核心区中两段顺向重复序列组成一个独特的 DNA 结合区. 碱性重复区不参与与 DNA 的结合, C 端 σ 同源区与结合 DNA 的不对称性和特异性有关^[1].

4 TFIIID 与转录起始复合物

与原核生物不同, 真核生物 RNA 聚合酶 II 不能单独识别启动子并与之结合. 而是先由基本转录因子与启动子形成一个前起始复合物 (preinitiation complex, PIC). PIC 的形成包括一系列基本起始因子有序的装配, 而 TFIIID 在此组装过程起关键性指导作用. AdML 启动子研究表明, PIC 的形成始于 TFIIID 与 TATA 元件的结合, 这一过程可能有 TFIIA 促进; 接着 TFIIIB 加入装配, 结合到启动子 DNA 上. 一般认为 TFIIIB 在结合启动子的 TFIIID 和聚合酶 II 之间起桥梁作用. 而后, 结合有 TFIIIF (RAP30/74) 的聚合酶 II 加入装配, TFIIIE 也随之进入, 形成功能性的 PIC (图 2). 如果没有 TFIIID 存在, 也就没有 TFIIA 和 TFIIIB 与 DNA 的结合. Smale 等研究证明, TFIIID 对于没有 TATA 元件的启动子转录起始也是必需的^[14]. 这类启动子转录起始点周围有一个启动元件 (initiator element, INR) 或核心序列 (core sequence), 对于介导 TBP 和启动子的稳定结合极为重要. 究竟 TFIIID 如何识别各种 TATA 元件和无 TATA 元件的核心序列, 目前尚不十分清楚.

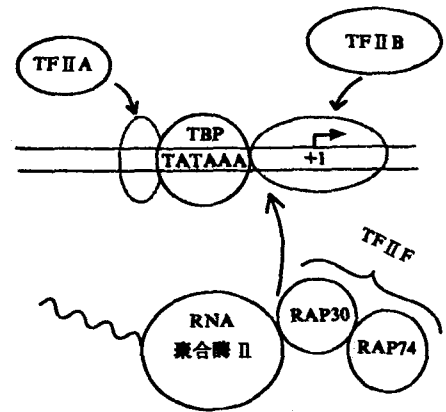


图 2 起始复合物的组装

Roy 等发现一种蛋白, 能识别包括起始点在内的序列并能促进无 TATA 元件启动子的转录活性^[15], 尽管尚未确定它是否为 DNA 不存在时与 TBP 紧密结合的 TAFs 组分, 但提示 TAFs 可能具有启动子特异性, 不同 TBP-TAFs 复合物识别不同的启动子.

关于 TFIIID 在转录起始中的作用目前又有新的发现: 在体外转录体系中加入 TBP 能刺激 RNA 聚合酶 II 指导的 U6 snRNA 基因转录活性 (Margottin 等, 1991 年); 体外转录时加入含 TATA 元件的 DNA 片段能够特异地竞争性抑制聚合酶 II 指导的 tRNA 基因的转录 (White 等, 1992 年). 这些实验提示, TBP 和 TAFs 可能在 RNA 聚合酶 II 指导的转录过程起重要作用.

不仅如此, 最近 Comai 等人还发现, 识别编码 rRNA 前体的基因启动子所必需的选择因子 1 (selective factor 1, SL1) 由 TBP 和分子量为 110, 63, 48kD 的 3 种 TAFs 组成. 人和鼠的 SL1 在转录体系中不能互换^[16]. 因而 SL1 中的 TAFs 可能特异地识别不同的 DNA 序列.

有关学者根据这些实验结果推测, TBP 可能是真核生物三种聚合酶指导的转录起始复合物的共同组分, 而 TAFs 则具有启动子特异性和聚合酶特异性, 在特定的启动子上选择特定的聚合酶类型, 以起始不同类型 RNA 的转录. 这一假设尚待进一步证实.

5 TFIIID 在转录调控中的作用

与 TFIIID 在前起始复合物装配过程中的核心作用一致, TFIIID 被认为是许多转录激活物如 USF, ATF, GAL4 等的重要作用物或靶分子. 最初 Wu 等人发现 E1A 蛋白对某些启动子的转录激活依赖于 TATA 元件的存在, 提示 TFIIID 可能与转录激活有关^[17]. 后来又发现人的转录因子 USF 与部分纯化的 HeLa 细胞的 TFIIID 在结合 DNA 时相互协同. 有酵母 GAL 蛋白、人的 ATF 蛋白存在时, 利用部分纯化的 TFIIID 在转录体系中的作用研究提示, 这些激活物可通过与 TFIIID 直接或间接作用加速起始复合物的形成, 使转录激活. 酸性激活物 E1A 的激活区可以和人 TBP 的 C 端保守区直接作用从而激活转录^[2]; 而一些激活物包括 SP1, USF, GAL4-VP16 则需要辅助激活物 (co-activator) 或“媒介物” (mediator)^[7,8]. 如 VP16 的激活区既可与 TFIIID 结合又可与 TFIIIB 结合^[18], VP16 激活作用所需要的“媒介物”, 可能是起“接应器”的作用, 后者将 VP16 连接到 TFIIIB 和 TBP 上; 或是起桥梁作用, 使两个 VP16 的激活区保持适当距离, 以便和 TFIIIB、TFIIID 同时结合. 目前, 对辅助激活物组成了解不多. 在果蝇和人的转录体系中, 重组 TBP 和天然 TFIIID 均能有效地识别 TATA 元件, 但只有天然 TFIIID 才能介导转录激活^[7]. 这表明与 TBP 结合的 TAFs 可能与转录激活有关. TAFs 的作用可能就是充当辅助激活物, 将激活物的信号传递给 TFIIID 的其它组分或其它基本转录起始因子. Dynlacht 等人的研究提示, 果蝇的激活因子 NTF-1 至少需要一种 TAFs 作为辅助激活物才能行使其转录激活功能.

最近一些实验提示, 如果部分纯化的人 TFIIID 或重组的 TBP 先结合到启动子上, 则能够解除体外核小体组装所造成的转录抑制^[19]. TFIIID 的这种去抑制作用可被一些激活蛋白如假性狂犬病病毒的 IE 蛋白, USF, Sp1, GAGA 因子, GAL-VP16 等加强. 但是, Taylor 等人对此观点提出疑问^[20]. 他们的实验提示 GAL-4

类似物单独存在时就能解除核小体组装产生的转录抑制, 而且 GAL-4 类似物能识别核小体中的结合位点. 孰是孰非, 尚待进一步证明.

最近从 TFIIID 中鉴别出一个活性片段或因子 USA (upstream factor stimulatory activity). USA 至少由两部分组成: 一为负性组分 (negative component, NC1), 它通过与 TFIIIA 竞争结合 TFIIID 来抑制基本水平的转录. 另一为正性组分 (positive component, PC1), 它可以和激活物结合, 使 NC1 的效应逆转, 从而提高启动子的转录活性. 一些激活物的转录激活机制可能与 USA 有关.

参 考 文 献

- 1 Yamamoto T, Horikoshi M, Wang J *et al.* A bipartite DNA binding domain composed of direct repeats in the TATA box binding factor TFIIID. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; **89**:2844
- 2 Lee W S, Kao C C, Bryant G O *et al.* Adenovirus E1A activation domain binds the basic repeat in the TATA box transcription factor. *Cell*, 1991; **67**:365
- 3 Reddy P, Hahn S. Dominant negative mutations in yeast TFIIID define a bipartite DNA-binding region. *Cell*, 1991; **65**:349
- 4 Lieberman P M, Schmidt M C, Kao C C *et al.* Two distinct domains in the yeast transcription factor IID and evidence for a TATA box-induced conformational change. *Mol Cell Biol*, 1991; **11**:63
- 5 Cormack B P, Strubin M, Ponticelli A S *et al.* Functional differences between yeast and human TFIIID are localized to the highly conserved region. *Cell*, 1991; **65**:341
- 6 Gill G, Tjian R. A highly conserved domain of TFIIID displays species specificity *in vivo*. *Cell*, 1991; **65**:333
- 7 Pugh B F, Tjian R. Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell*, 1990; **61**:1187
- 8 Peterson M G, Tanese N, Pugh B F *et al.* Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA binding proteins. *Science*, 1990; **248**:1625
- 9 Hahn S, Buratowski S, Sharp P A *et al.* Yeast TATA-binding protein TFIIID binds to TATA elements with both consensus and nonconsensus DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; **86**:5718
- 10 Horikoshi M, Yamamoto T, Ohkuma Y *et al.* Analysis of structure-function relationships of yeast TATA bind-

- ing factor TFIIID. *Cell*, 1990; **61**:1171
- 11 Starr D B, Hawley D K. TFIIID binds in the minor groove of the TATA box. *Cell*, 1991; **67**:1231
 - 12 Lee D K, Horikoshi M, Roeder R G. Interaction of TFIIID in the minor groove of the TATA element. *Cell*, 1991; **67**: 1241
 - 13 Nash H A, Granston A E. Similarity between the DNA-binding domains of IHF protein and TFIIID protein. *Cell*, 1991; **67**:1038
 - 14 Smale S T, Schmidt M C, Berk A J *et al.* Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator; specific requirement for mammalian transcription factor IID. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**:4509
 - 15 Roy A L, Meisterernst M, Pogmonec P *et al.* Activation of class II gene transcription by regulatory factors is potentiated by a novel activity. *Nature*, 1991; **354**:245
 - 16 Comai L, Tanese N, Tjian R. The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor, SL1. *Cell*, 1992; **68**:965
 - 17 Wu L, Rosser D S E, Schmidt M C *et al.* A TATA box implicated in E1A transcriptional activation of a simple adenovirus 2 promoter. *Nature*, 1987; **326**:512
 - 18 Lin Y-S, Green M R. Mechanism of action of an acidic transcriptional activator *in vitro*. *Cell*, 1991; **64**:971
 - 19 Meisterernst M, Horikoshi M, Roeder R G. Recombinant yeast TFIIID, a general transcription factor, mediates activation by the gene-specific factor USF in a chromatin assembly assay. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**: 9153
 - 20 Taylor I C A, Workman J L, Schuetz T J *et al.* Activation domains of stably bound GAL4 derivatives alleviate repression of promoters by nucleosomes. *Genes Dev*, 1991; **5**:1285

乙型肝炎病毒变异株研究进展

叶 昕 甘人宝

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

提 要

乙型肝炎病毒在其复制过程中需通过以 RNA 为中间体的逆转录过程, 因而其突变率较一般的 DNA 病毒高, 随着对 HBV 研究普遍和深入开展, 最近几年发现了一些新的具有不同生物功能的变异株. 文章综述了近年来对 HBV 变异株研究的进展, 内容主要包括: 表面抗原相关变异, e 抗原表达变异, 核心抗原相关变异以及变异与肝癌的关系.

关键词 乙型肝炎病毒, 乙肝疫苗, 变异株

乙型肝炎是严重危害人类健康的传染病. 最新的统计表明, 世界上 HBV (乙型肝炎病毒) 携带者已占人口 5%. 中国是世界上受害最严重的国家, 目前携带乙肝病毒的患者已有一亿多, 每年通过母亲传染的新生儿患者已达百万人以上. 乙型肝炎的病原体是一个较小的 DNA 病毒——乙型肝炎病毒 (HBV). 因而开展对 HBV 深入研究, 无论从基础理论, 基因工程疫苗乃至临床诊断及治疗都是具有重大意义的研究课题.

1979 年巴斯德研究所 Tiollais 等人首先发表了 ayw HBV DNA 的结构, 从而开创了 HBV 分子生物学的研究. HBV 基因组含有 4 个开放阅读框架, 它们分别编码表面抗原 (HBsAg), 核心抗原 (HBcAg), 内源聚合酶和 X 蛋白^[1]. 按照表面抗原免疫特性分类, HBV 主要可分成 adr, adw ayr, ayw4 种亚型变异株. HBV 虽很小仅 3.2kb, 但其包含了一个病毒所具有的生