

研究报告

数据综合分析鉴定人类 Auxilin 基因*

刘春宇 张春玲 夏家辉

(湖南医科大学医学遗传学国家重点实验室, 长沙 410078)

摘要 Auxilin 蛋白诱导 Hsp70c 蛋白与笼形蛋白的结合, 在真核细胞衣被小泡脱衣被的过程中扮演了重要的角色. 通过对已有 EST, STS 等数据库的综合分析, 我们将人类 auxilin 基因定位到 1p31, D1S515 和 D1S198 标记之间. 26 个 EST 构成的 5 个重叠群, 占该基因中共约 2.3 kb 的部分 cDNA 序列, 其中编码区长 501 bp, 得到的序列与牛的 auxilin 基因显示有极高的同源性. 各 EST 数据显示, auxilin 在人胚胎的多种组织中表达, 在成人脑、表皮组织中也有表达.

关键词 auxilin 基因, 定位, 序列, 数据综合分析

学科分类号 R394.3

真核生物细胞中的衣被小泡, 是细胞器间物质运输以及细胞进行内吞, 尤其是受体介导内吞作用的重要方式. 衣被小泡的衣被主要由三叉枝状的笼形蛋白 (clathrin) 聚合成的球状体构成, 笼形蛋白球状体装配、解聚、再装配的循环是衣被小泡行使功能的主要过程. Ahle 等^[1]在牛脑组织衣被小泡的研究中发现 auxilin 蛋白和 AP180 都是衣被中的重要组成. 结构型的 70 ku 的热休克蛋白 (Hsp70c) 具有 ATP 酶的活性, 催化笼形蛋白球状体解聚 (衣被小泡脱衣被), 1995 年 Ungewickell 等^[2]研究发现, auxilin 是 Hsp70c 完成其催化功能的重要辅助因子. Auxilin 与笼形蛋白装配成的网架结构相结合时, 其羧基端的 J 功能域 (J-domain) 则与 Hsp70c 作用, 诱导 hsp70c 与衣被的结合, 同时激活 Hsp70c 的 ATP 酶活性^[2~5]. 1995 年 Schroder 等^[6]克隆了源于牛脑组织的 auxilin 基因, 这是目前公共数据库中唯一完整的 auxilin 基因序列. 通过免疫印迹方法和 RNA 杂交分析, 一般认为 auxilin 基因有在脑组织中特异表达的特性^[1, 6]. 通过对已有公开数据库, 包括表达序列标记 (expressed sequence tags, EST)、序列标记位

点 (sequence tag site, STS), 人类基因索引 (human gene index, HGI), Unigene 等数据库的分析, 我们得到一批人 auxilin 的表达序列片段 (EST), 并在人基因组中定位了此基因. 同时, EST 数据提示人类 auxilin 的表达不只限于脑组织.

1 材料方法

1.1 软件与数据库

采用 GCG 的 SeqLab 9.1 软件包进行核酸和蛋白质序列分析, 核酸数据库为 GenBank 104.0 版, EMBL52.0 版. 蛋白质数据库为 PIR 54.0 版, SWISSPROT 35.0 版. 通过 INTERNET 查询美国国家生物技术信息中心 (National Center of Biotechnology Information, NCBI) 的 Unigene 数据库, 和基因组研究所 (The Institute of Genome Research, TIGR) 的人类基因索引 (HGI) 数据库.

1.2 数据分析

以牛 auxilin 基因 cDNA 序列 (GenBank:

* 国家高技术发展计划 (863 计划) 和 SmithKline Beecham 湖南医科大学合作研究项目资助.

收稿日期: 1998-02-14, 修回日期: 1998-06-08

U09237) 对 EST 数据库进行 Blast 分析, 将得到的 P 值小于 0.002 的人类 EST 与 GenBank 比较, 去除与已克隆人类基因相似性大于 90% 的 EST. 余下的 EST 以 Seqlab 之 Fragment Assembly 构建重叠群. 各重叠群的同义序列用 FASTA 和 TFASTA 程序与 U09237 比较, 根据相似区段的位置绘制同源重叠群图.

以 EST 对 STS 数据库进行 Blast 分析, 根据一致的 STS 进行基因定位. 再据 GDB 数据

库将 STS 的定位与细胞遗传学的染色体区带对应.

2 结 果

2.1 人类 *auxilin* 的 EST 重叠群及基因序列

以牛 *auxilin* 基因的 cDNA 序列在 EST 数据库中作同源搜寻, 得到人的显著同源 EST 共 26 个, 共构成 5 个重叠群, 其中 4 个重叠群只有单一 EST, 1 个重叠群 (*aux-con3*) 由 22 个 EST 构成. 5 个重叠群的组成见表 1.

表 1 人类 *auxilin* EST 重叠群

EST 重叠群编号	cDNA 克隆号	5' EST GenBank 编号	3' EST GenBank 编号	cDNA 组织来源
<i>aux-con1</i>	446850	AA203616		胎肝脾
<i>aux-con2</i>	kk6041	N84123		胎心
<i>aux-con3</i>	c0zf08	Z42974 ¹⁾		婴儿脑
	c0jc08	Z42434		婴儿脑
	235187	H78762 ¹⁾	H78679 ¹⁾	胎肝脾
	c1zf12	Z44405		婴儿脑
	c0jc07	F05692		婴儿脑
	39627	R52420 ¹⁾		婴儿脑
	GEN-407H08	D55950		胎脑
	GEN-400C01	D55738		胎脑
	24126	T78206 ¹⁾		婴儿脑
	30560	R18208 ¹⁾		婴儿脑
	31641	R36734 ¹⁾		婴儿脑
	24172	T78747 ¹⁾		婴儿脑
	46200	H09209 ¹⁾		婴儿脑
	23049	T75068 ¹⁾		婴儿脑
	23048	T75067 ¹⁾		婴儿脑
	245094		N54363 ¹⁾	胎肝脾
	274045	N48413 ¹⁾		黑色素细胞
	ATCC: 122605	AA322036 ¹⁾		小脑
	c3g09	F12912 ¹⁾		婴儿脑
	c3gc10	F12913 ¹⁾		婴儿脑
	DKFZphsnu1-1a7	Z98480 ¹⁾		成人丘脑下核
<i>aux-con4</i>	24126		R37867 ¹⁾	婴儿脑
<i>aux-con5</i>	274045		N38951 ¹⁾	黑色素细胞

¹⁾ Unigene Hs. 106891 中有的 EST.

因 EST 为一次性测序的结果, 一般存在 5% 左右的序列误差. 以与牛 *auxilin* 同源的序列段作为 EST 中有效序列段, 比较各重叠群有效序列段与牛 *auxilin* 的基因关系, 可见 5

个重叠群与牛 *auxilin* 同源序列的位置如图 1, 两个重叠群位于编码区内, 两个位于 3' 非编码区, 一个最长的重叠群跨于终止密码子两侧.

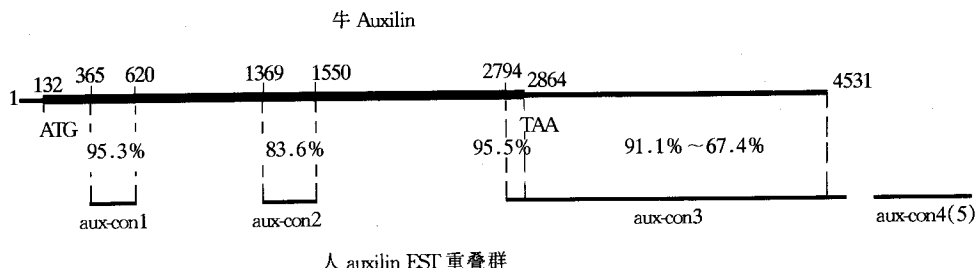


图 1 牛 *auxilin* 基因与人 *auxilin* EST 重叠群对比图

粗线标示牛 *auxilin* 基因的阅读框及起止密码子位置. 百分比值示同源区段间核酸序列的相同碱基比例. 4, 5 号重叠群处于基因的 3' 非编码区且无牛 *auxilin* 基因对应序列, 故二者相对位置不能确定, 但因均为 3 号重叠群中 EST 所在 cDNA 克隆的 3' 端, 也即在基因的 3' 端.

将我们得到的全部有效序列及其翻译的蛋白质序列与牛 *auxilin* 基因及其编码的蛋白质序列比较, 结果如图 2. 在编码区 EST 重叠群对应的三个同源区段间核酸序列的一致性分别为 95.3% (255 bp), 83.6% (181 bp), 95.5% (70 bp); 而蛋白质序列间的一致性分别为 98.8% (85 个残基), 88.5% (60 个残基) 和 100% (21 个残基). 3' 非编码区中的序列除前 100 bp 段达 91.1% 一致外, 相似性在 67.4% 到 85.3% 之间, 平均相似性为 76.2%.

在有效序列翻译得到的多肽序列中, 第一个片段为 tensin 同源段, 在 C 端氨基酸序列为 J-domain 的一部分, 据已有的研究, J-domain 是 *auxilin* 行使功能所必需. 这进一步肯定了我们得到的是人类的 *auxilin* 基因.

人类 *auxilin* 的编码片段与鸡的 Tensin 及鼠等的周期素 G 相关激酶等蛋白质显著同源.

2.2 人类 *auxilin* 基因的定位

EST H78762 中含有一 STS 序列: G26332, 而此 STS 定位于 1 号染色体, 在四个表达序列定位图谱中的定位分别为: WI-18348 图谱和 A003M20 图谱中定位于 D1S515 与 D1S198 之间; 位于放射杂交定位图中 1 号染色体 213.0cR 处.

在 GDB 数据库查询, D1S515 位于 D1S203 和 D1S198 之间, 三标记均处在染色体 1p31 处.

2.3 人类 *auxilin* 基因的表达情况

根据获得的人类 *auxilin* 的 EST 来源 (表 1), 可知 *auxilin* 基因的 EST 有 17 个源于胎脑 cDNA 文库, 占全部 cDNA 克隆的 68%. 提示此基因在胎脑中表达丰度很高. 同时, 在胎肝脾、胎心、黑色素细胞、小脑及丘脑下核等 cDNA 文库中也得到 *auxilin* 的部分序列, 说明在这些组织和发育阶段中 *auxilin* 也有表达.

	81	160
{BOV_AUX}	GGCGGCAGCGCGGAGTCCCGCCCGGCAGCCTCAGGACCGGCCAGCACCATGGACAGCTCAGGTGCCTCATCTCCAGA	
{HU_AUX}		
{HU_AUXP}		
{BOV_AUXP}	M^D^S^S^G^A^S^S^P^D^	
		
	321	400
{BOV_AUX}	ACITATGTTACCTCCAGAATTATTGFGATGTCCITTCCTCTGGACAGTGTGACATAGGATTACAGGAATCAGGTTGATGA	
{HU_AUX}	GACAATGTTGACATAGGATTACAGGAATCAGGTTGATGA	
{HU_AUXP}	D^N^V^D^I^G^F^R^N^Q^V^D^D^	
{BOV_AUXP}	T^Y^V^T^S^R^I^I^V^M^S^F^P^L^D^S^V^D^I^G^F^R^N^Q^V^D^D^	
	401	480
{BOV_AUX}	TATTGCAAGCTTTTGGATTCCAGACATCTTGACCACTACACGGFATACAATCTGTGCGCCAAGTCTTATCGAACTGCCA	
{HU_AUX}	CATTGCAAGCTTTTGGATTCCAGACATCTTGACCACTACACAGTATACAATCTGTCACTAAGTCTTATCGAACTGCCA	
{HU_AUXP}	I^R^S^F^L^D^S^R^H^L^D^H^Y^T^V^Y^N^L^S^P^K^S^Y^R^T^A^K	
{BOV_AUXP}	I^R^S^F^L^D^S^R^H^L^D^H^Y^T^V^Y^N^L^S^P^K^S^Y^R^T^A^K	
	481	560
{BOV_AUX}	AGTTTCACAGCAGGGTCTCAGAA TGCAGITGCCCCATCAGGCAGGCCCCAGCCTGCACAACCTCTTGTCTGTGTGCGG	
{HU_AUX}	AGTTTCACAGCCGGTCTCAGAATGCAGITGCCCCATTAGGCAGGCTCCAGTCTGCACAACCTTTTGTCTGTGTGCGG	
{HU_AUXP}	F^H^S^R^V^S^E^C^S^W^P^I^R^Q^A^P^S^L^H^N^L^F^A^V^C^R^	
{BOV_AUXP}	F^H^S^R^V^S^E^C^S^W^P^I^R^Q^A^P^S^L^H^N^L^F^A^V^C^R^	
	561	640
{BOV_AUX}	AATATGTATAACTGGCTACTACAGAATCCCAAAAACGTCCTGTGTGTGCCACTGCTTGGATGGACGGGCAGCATCATCGAT	
{HU_AUX}	AATATGTATAACTGGCTACTGCAGAATCCCAAAAATGTCTGTGTGTGCCACTGCTTG	
{HU_AUXP}	N^M^Y^N^W^L^L^Q^N^P^K^N^V^C^V^V^H^C^L^.....	
{BOV_AUXP}	N^M^Y^N^W^L^L^Q^N^P^K^N^V^C^V^V^H^C^L^D^G^R^A^A^S^S^I^	
		
	1361	1440
{BOV_AUX}	TCCAGATAATCCAGACATTTTGGGCAAGGTGGCTTCTTTTCCACTCTCTGCTGGCAAGATCAGAAATCGGAGAAGTCAT	
{HU_AUX}	...gACAACCAAGGCATTACGGACAAAGTGTTTCCCTTGCCTCTCTCTGTGGCAAGATCAGAAATCGGAGAAGTCAT	
{HU_AUXP}	...D^N^P^R^H^Y^G^Q^S^G^F^L^A^S^L^C^W^Q^D^Q^K^S^E^K^S^S	
{BOV_AUXP}	P^D^N^P^R^H^F^G^Q^G^G^F^F^S^T^L^C^W^Q^D^Q^K^S^E^K^S^F	
	1441	1520
{BOV_AUX}	TCTGCGAGGAGGACCAGCTGCCCTAGTGAATCAGGAGAGTGAGCACTCAGACGATGAGCTTCTGACGCTGTCCAGCCCA	
{HU_AUX}	CTTGTGAGGAAGACCAGCTACCCCTAGTGAATCAGGAAAAGTGAGCAATCAGATGATGACCTTCTGCCACTTTCCAGTCCG	
{HU_AUXP}	C^E^E^D^H^A^T^L^V^N^Q^E^S^E^Q^S^D^D^D^L^L^P^L^S^S^P^	
{BOV_AUXP}	C^E^E^D^H^A^A^L^V^N^Q^E^S^E^Q^S^D^D^E^L^L^T^L^S^S^P^	
	1521	1600
{BOV_AUX}	CATGGCAATGCCAATGGTGACAAACCTCAGCGAGCCAGGAAGCCGAGCAAAAAGCAGCAGGAGCCAGCTGCCCTGCACC	
{HU_AUX}	CATGGCAATCCCATTGGTGACAAGCCT.	
{HU_AUXP}	H^G^N^P^I^G^D^K^P^.....	
{BOV_AUXP}	H^G^N^A^N^G^D^K^P^H^A^A^R^K^P^S^K^K^Q^Q^E^P^A^A^P^A^P^	
		
	2721	2800
{BOV_AUX}	AAGGTGTACAGGAAGGCTGTGCTAGTGCTGCACCCGGATAAAGCTACTGGGCAACCCCTATGAACAATATGCAAAGATGAT	
{HU_AUX}	GAT	
{HU_AUXP}	I^	
{BOV_AUXP}	K^V^Y^R^K^A^V^L^V^V^H^P^D^K^A^T^G^Q^P^Y^E^Q^Y^A^K^M^I^	
	2801	2880
{BOV_AUX}	TTTCATGGAGCTCAATGATGCCTGGTCAGAATTTGAAAAATCAAGGCCAAAAGCCCTTGATTAACTTATGAGCTTTTCCA	
{HU_AUX}	TTTCATGGAGCTCAATGATGCCTGGTCGAATTTGAAAACCAAGGCCAAAAGCCCTTATATTATTTATGAGCTTTTCCA	
{HU_AUXP}	F^M^E^L^N^D^A^W^S^E^F^E^N^Q^G^Q^K^P^L^Y^*.....	
{BOV_AUXP}	F^M^E^L^N^D^A^W^S^E^F^E^N^Q^G^Q^K^P^L^Y^*.....	

图2 牛 auxilin 基因与人 auxilin 片段的核酸和多肽序列比较

BOV_AUX 为牛 auxilin cDNA 序列，BOV_AUXP 为牛 auxilin 的蛋白质序列，HU_AUX 为人 auxilin 片段，HU_AUXP 为人 auxilin 多肽片段。阴影覆盖的为两种蛋白质间不同的残基，数字表示牛 auxilin cDNA 中的碱基位置。

3 讨 论

3.1 人类 auxilin 的基因表达不只限于脑组织

Ahle 等^[1]以免疫印迹的方法在牛脑、肝、肾上腺组织中做了牛 auxilin 的表达分析, 只发现在脑中有该基因的表达. 而推测该基因可能为神经细胞的某种独特功能服务. Schroder 等^[6]进行了小鼠脑、心、肝、肾、脾中的 RNA 印迹实验, 也只在脑中发现有 auxilin 的表达. 而 Maycox 等^[7]的研究则显示神经组织的衣被小泡中 auxilin 是主要组成之一. 因此目前一般认为 auxilin 是一种脑特异囊泡相关的蛋白质^[8].

本研究的分析显示人 auxilin 在多种组织(脑、肝脾、心、皮肤)中, 尤其是胚胎的多种组织(肝脾、心)中有表达. 而这些有表达的组织或发育阶段恰是 Ahle, Schroder 等的研究所未涉及到的. 这一结果提示文献中报道 auxilin 仅在脑中表达的结果可能并不全面. 换言之, auxilin 可能不只在神经系统中发挥作用, 而是有更广泛的生理功能.

3.2 人类 auxilin 基因全长 cDNA 的克隆

auxilin 基因的大体框架结构已通过 EST 的分析建立, 据此, 只需以 RT-PCR 和 5' RACE 的方法填补缺口, 即可很容易得到此基因的全长 cDNA 序列. 对已有 cDNA 克隆的再测序, 尤其是 446850 和 kk6041 两个克隆的测序可能为获取 auxilin 的完整编码序列提供直接的帮助.

3.3 利用综合数据分析进行基因分离、定位及表达研究

目前国际上两个主要进行公开 EST 数据分析的研究项目是 NCBI 的 Unigene 项目和 TIGR 的 HGI 项目, 在 Unigene 中有一个 EST 簇(cluster): Hs. 106891, 其中包含了我们分析得到的 26 个 EST 中的 19 个(位于我们得到的 3、4、5 号重叠群中), 并且提供了该 EST 簇的分子标记定位. 但并不明确此簇与 auxilin 基因的关系. 在 HGI 中, 一个 EST R72017 推测为 auxilin 基因的部分. 而我们的

分析显示 R72017 是人类周期素 G-相关激酶(HsGAK)的一部分, 而非 auxilin 的组成. 这可能是因为 auxilin 与 HsGAK 同源性较高造成的误差. 本研究将 EST 序列、定位、表达、cDNA 克隆等数据进行了全面的综合分析, 得出了有关 auxilin 基因结构和表达、定位等的重要新信息.

总之, 通过综合数据分析, 我们得到了人类 auxilin 基因的部分序列及基因的大体结构, 并将之定位在 1p31. 这是人类基因组计划进展到今天, 利用已有数据开展基因克隆的一种成功尝试, 为人类 auxilin 基因的全长克隆创造了便利的条件. 有关 auxilin 表达的新认识, 对于我们了解 auxilin 在生命过程中的功能具有重要的提示作用.

参 考 文 献

- 1 Ahle S, Ungewickell E. Auxilin, a newly identified clathrin-associated protein in coated vesicles from bovine brain. *J Cell Biol*, 1990, **111** (1): 19
- 2 Ungewickell E, Ungewickell H, Holstein S E *et al.* Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature*, 1995, **378** (6557): 632
- 3 Ungewickell E, Ungewickell H, Holstein S E. Functional interaction of the auxilin J domain with the nucleotide- and substrate-binding modules of Hsc70. *J Biol Chem*, 1997, **272** (31): 19594
- 4 Jiang R F, Greener T, Barouch W *et al.* Interaction of auxilin with the molecular chaperone, Hsc70. *J Biol Chem*, 1997, **272** (10): 6141
- 5 Holstein S E, Ungewickell H, Ungewickell E. Mechanism of clathrin basket dissociation: separate functions of protein domains of the DnaJ homologue auxilin. *J Cell Biol*, 1996, **135** (4): 925
- 6 Schroder S, Morris S A, Knorr R *et al.* Primary structure of the neuronal clathrin-associated protein auxilin and its expression in bacteria. *Eur J Biochem*, 1995, **228** (2): 297
- 7 Maycox P R, Link E, Reetz A *et al.* Clathrin-coated vesicles in nervous tissue are involved primarily in synaptic vesicle recycling. *J Cell Biol*, 1992, **118** (6): 1379
- 8 Cheetham M E, Anderton B H, Jackson A P. Inhibition of hsc70-catalysed clathrin uncoating by HSP70 proteins. *Biochem J*, 1996, **319** (Pt 1): 103

Identification and Mapping of Human Auxilin Gene by Integrated Data Analysis. LIU Chun-yu, ZHANG Chun-ling, XIA Jia-hui

(National Laboratory of Medical Genetics of China, Changsha 410078, China).

Abstract Auxilin is a molecular chaperon which induces binding of Hsp70c to clathrin, playing an important role in uncoating of coated vesicle isolated from brain. Through integrated analysis of public database such as dbEST, dbSTS, partial cDNA sequence of human auxilin was identified and mapped to 1p31, between marker D1S515 and D1S198. Totally 26 ESTs were found to be part of human auxilin and used to

construct five contigs, which make totally 2.3 kb sequence and contains 501 bp coding sequence. All the sequences obtained and the corresponding putative translation showed high homologous to bovine auxilin. At the same time, EST data indicate that human auxilin expressed in several tissues at fetal stage, also in brain and melanocyte at adult stage.

Keywords auxilin, localization, sequence, expression, integrated data analysis

异搏定拮抗 α -石英细胞毒性作用的研究*

朱卫华¹⁾ 王金晞²⁾ 李海山 陈 瑶

(南京大学配位化学研究所, 配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

摘要 借助于单细胞阳离子测定系统等手段, 研究了不同细胞外钙浓度下异搏定作用后, 细胞存活率与细胞内游离钙浓度 ($[Ca^{2+}]_i$) 的变化关系. 同时还研究了异搏定对实验性硅肺大鼠模型的作用. 结果表明: 由 α -石英引起的肺泡巨噬细胞内钙升高是由于大量细胞外钙内流, 造成细胞内钙超载, 引起细胞死亡, 并进一步导致硅肺形成. 异搏定可以抑制细胞内钙增加, 降低细胞的死亡. 动物模型实验结果还表明异搏定对硅肺的发生有明显的抑制作用. 提示异搏定可能成为硅肺的防治药物.

关键词 异搏定, α -石英, 细胞存活率, 细胞内钙浓度, 硅肺

学科分类号 R135.2, R994.6, R972

过去研究发现实验性硅肺大鼠在染尘 3~5 d 后, 肺匀浆游离钙离子浓度明显升高, 以后增加量与时间成正相关, 表明肺匀浆钙离子浓度升高可能是反映肺组织发生病变的重要现象^[1,2]. α -石英对肺泡巨噬细胞的毒性作用是硅肺发生的第一步重要反应^[3]. 钙离子在 α -石英诱发巨噬细胞毒性作用中起着重要作用^[4]. 我们曾发现 α -石英能引起巨噬细胞内游离钙离子浓度升高, 这可能是由于细胞外钙内流所致^[5]. Rojanasakul 等^[6] 研究发现 α -石英作用后伴随着细胞损伤的细胞外钙内流增加, Nifedipine 可以抑制低剂量的内钙增加. 本工作研究了不同细胞外钙浓度的条件下, 异

搏定对 α -石英的细胞毒性和由 α -石英诱发的细胞内钙升高的抑制作用, 并研究了异搏定对硅肺动物模型的作用.

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

单细胞阳离子测定系统 (美国 SPEX 公司产品); AFX-DX 型荧光倒置显微镜 (日本 Nikon 公司产品); 1815 TC 型 CO_2 培养箱

* 国家自然科学基金资助课题 (29271022).

¹⁾ 镇江医学院, 镇江 212001.

²⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1997-06-11, 修回日期: 1997-12-10