

细胞因子和生长因子信号转导途径中 信号蛋白分子的核转运机制*

宋伦** 黎燕 沈倍奋

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 信号蛋白分子的入核及出核转运是细胞因子和生长因子信号转导途径中的重要环节。核定位序列 (NLS) 是信号蛋白分子上与入核转运相关的氨基酸序列。核孔复合物 (NPC)、核转运蛋白 importin 和能量供应体 Ran/TC4 在入核转运过程中也发挥了重要作用。另外, 很多细胞因子和生长因子或其受体上所具有的 NLS 序列也具有核定位功能, 并可能通过“伴侣机制”参与其他信号蛋白分子的入核转运。

关键词 核转运, 核定位序列 (NLS), 核转运蛋白, Ran/TC4, 伴侣机制

学科分类号 R392.11

在细胞因子和生长因子的信号转导过程中, 细胞因子和生长因子首先与靶细胞膜表面的相应受体结合并导致受体活化; 继而激活的受体可通过胞浆中一系列信号蛋白分子的级联活化反应, 最终诱导细胞核内相应的靶基因表达并表现出一定的生物学效应。在此过程中, 信号蛋白分子由胞浆进入细胞核的入核转运及反方向的出核转运, 是实现整个信号途径传递功能的一个非常重要的调控点^[1]。本文将对信号蛋白分子的核转运过程及其分子机制作一简要综述。

1 信号蛋白分子入核的一般过程

真核细胞的核膜是控制细胞浆和细胞核之间进行物质交换的通透屏障。核膜上散在的孔状通道——核孔是物质实现跨核膜转运的重要通道。能够通过核孔运输的物质根据分子质量大小不同, 其转运机制也有所差别。其中离子和分子质量小于 45 ku 的蛋白质分子在不需要外界能量供应前提下即可实现在核孔处的自由出入, 因此其转运过程属被动运输性质。而对于分子质量大于 45 ku 的蛋白质分子来说, 它们跨越核膜的运输必须在核转运蛋白的协助和外界提供能量时才能够实现, 因此属于主动运输性质。

目前的研究结果证明: 通常在核孔处聚集有 100~200 种不同类型的蛋白质分子可参与并协助被运输物的核转运过程, 它们共同形成了一个蛋白质复合物, 称为核孔复合物 (nuclear pore complex, NPC)。因此, 被运输物可通过“非能量依赖的与核孔胞浆一侧结合”和“依赖能量供应的由 NPC

所介导的入核”两个连续的步骤实现由胞浆进入细胞核的转运过程^[2]。

2 入核信号蛋白分子及其结构特征

在细胞因子和生长因子的信号传递过程中, 细胞内的级联活化反应主要包括胞浆中蛋白激酶和转录因子以及一系列调控分子的诱导活化。经过研究发现: 在不同的信号途径中, 蛋白激酶和转录因子可分别实现核定位功能。例如蛋白激酶 A (PKA) 由 2 个催化亚基 (C 亚基) 和 2 个调节亚基 (R 亚基) 组成。当 cAMP-PKA 途径被激活时, cAMP 结合于 PKA 的 R 亚基, 并促使 R 亚基与 C 亚基解离; 游离的 C 亚基进入活化状态并转位至细胞核内, 通过激活转录因子 cAMP 反应成分结合蛋白 (CREB) 诱导 cAMP 反应基因转录表达。另外, 不同亚类的蛋白激酶 C (PKC)、Ras 信号途径中的一系列蛋白激酶 MEK1、MAPK、RSK 等也都具有相似的入核功能^[3]。除此之外, 一些在静止状态下存在于胞浆中的转录因子也可在刺激因素的作用下活化并进入细胞核内。例如信号转导子和转录激活子家族 STATs, 它们可在其上游蛋白激酶 JAK 的催化作用下实现 Tyr 残基的磷酸化并由胞浆转位至核内^[4]。激活的 T 细胞中的转录因子 NFAT、Rel 家族转录因子 NF- κ B 等也可在相似机制介导下实现入核转运过程^[5]。总之, 在参与信

* 国家杰出青年科学基金资助 (39925019)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-66931326, E-mail: lunsong@yahoo.com

收稿日期: 2001-07-03, 接受日期: 2001-09-12

号转导途径的众多信号蛋白分子中, 只有某一中间分子(蛋白激酶或转录因子)发生由胞浆到胞核的转位过程才能最终实现靶基因在核内的诱导表达和特定的生物学效应。

能够入核的高分子质量信号蛋白分子在一级结构上都存在有一个共同的特征, 即含有一段保守的氨基酸序列, 称为核定位序列(nuclear localization sequence, NLS)。目前研究结果所揭示的核定位序列主要有两类: 一类为单一型 NLS(monopartite), 也称 I 型 NLS, 即由一段连续的碱性氨基酸顺序排列而成的 NLS 序列; 其典型代表是 SV40 大 T 抗原上的 NLS(SV40-Tag-NLS)——“RKKKRKV”。另一类为双分型 NLS(bipartite), 也称 II 型 NLS, 其特点是由两簇碱性氨基酸被中间 10~12 个非保守性氨基酸所分隔而形成的序列; 其典型代表是爪蟾核浆素(nucleoplasmin)上的 NLS——“KRPAATKKAGQAKKKLKD”。这两类 NLS 序列都具有引导本身包含有它们的信号蛋白分子及其他异源蛋白质进入细胞核的功能^[6]。需要强调的是, 并不是所有的符合两类 NLS 序列特征的氨基酸序列都具有核定位功能, 例如 IL-1 β 和 GP130 上的 NLS 序列即不具有核定位功能, 人们把这种 NLS 序列称为假定 NLS(putative NLS)^[3,7]。

3 协助实现核转运功能的核转运蛋白和能量供应体

为什么含有 NLS 序列的信号蛋白分子能够实现核定位功能呢? 这是因为含有 NLS 序列的靶蛋白可首先与胞浆中的核转运蛋白(importin)形成一个靶向核孔的复合物, 然后再与核孔上的 NPC 结合并进入核内。importin 是由 α 、 β 两个亚基所组成的异源二聚体蛋白质。其中 α 亚基 60 ku 也称为 NLS 受体, 因为它能够与靶蛋白上的 NLS 发生直接相互结合作用, 而其上所含有的 β 亚基结合位点又可介导 NLS 靶蛋白/ α 亚基复合物继续结合 β 亚基 97 ku, 后者可使这个三分子复合物结合于 NPC 并实现核转运功能。通常情况下, NLS 靶蛋白、importin α 和 importin β 可形成比例为 1:1:1 的牢固复合体^[8]。

目前的研究结果已揭示的 importin α 包括两类分子: 分别为 NPf-1/hSRP 和 Rch1/hSRP1 α , 二者之间有近 50% 的基因同源性。并且它们在参与含有 I 型和 II 型 NLS 序列靶蛋白的入核转运过程中

功能相当^[9,10]。目前, 人们已经分别获得了 importin α 与 SV40-Tag-NLS 和核浆素 NLS 的共结晶体, 并发现 I 型 NLS 可结合于 importin α 的两个不同的结合位点; 而 II 型 NLS 中的两簇碱性氨基酸可结合于与 I 型 NLS 同样的两个位点, 但中间的非保守性氨基酸呈游离状态。这也解释了为什么众多各异的 NLS 序列可结合同样的 importin α 分子^[11]。但需要明确的是, 不同 NLS 序列与 α 亚基的结合亲和力不同会直接影响靶蛋白的入核速度。

由于 importin β 的主要功能在于桥联 NLS 靶蛋白/ α 亚基复合物和 NPC, 因此对于它的研究相对较少, 但人们还是找到了一些新的 β 亚基相关蛋白, 并且在低等和高等生物中都得到了证实^[3]。

在信号蛋白的核转运过程中, 为转运提供能量的分子是 NPC 上的 GTPase Ran/TC4。它可通过水解 GTP 而进行能量供应。已有实验证实, 无 GTP 水解酶活性或只能够结合 GDP 而不能结合 GTP 的 Ran 突变体不能为核转运提供能量^[12]。另外, ATP 也可作为核转运的能量供应体, 但其作用机制至今不详。推测它可能作为 GTP 的替代物成为 Ran 的水解底物而实现供能作用^[3]。

综合以上内容, 信号蛋白分子跨核膜的转运过程主要是通过 NLS 靶蛋白-importin α -importin β -NPC(Ran/TC4) 的顺序结合而实现的。

4 细胞因子和生长因子信号途径中信号蛋白分子入核的新模式

随着近些年来细胞因子和生长因子信号转导机制研究的不断深入, 人们相继发现了一些细胞因子和生长因子或它们的受体上含有符合 NLS 特征的氨基酸序列(表 1); 并且通过实验证实, 它们都具有不同程度的核定位功能。这个结果使人们认识到: 细胞因子和生长因子及其受体的作用不只是局限于胞膜水平的相互结合, 实际上它们被细胞内化(internalization)后仍能够参与后续的信号传递反应, 如核转运功能。也就是说, 配基与受体结合并内化后可进一步结合并激活一系列的胞浆信号蛋白分子, 并在配基或受体上 NLS 序列的引导下, “携带”其他的无 NLS 序列而必须入核后才能实现相应功能的蛋白质分子进入核内。人们称这种入核方式为“伴侣机制”(chaperon mechanism)^[13]。IFN- γ 信号途径中 STAT1 的入核过程即可能是通过 IFN- γ 上的 NLS 序列引导而实现的。

Table 1 Functional NLSs on cytokines, growth factors and their receptors

表 1 细胞因子、生长因子或其受体上的功能性 NLS 序列

因子或受体	NLS 序列
PDGF	PRESGKKRKRK*
IFN- γ	RKRKRSK*
Pro-IL-1 α	KVLKKRRL*
IL-5	KKYIDQKKKCGEERRV**
Pro-IL-16	KKGPPVAKPAWFRQSLKGLRNR**
Insulin-R	RRSYALVSLFFRKLR**
GH-R	VRVRSKQRN*
GM-CSF-R	RNSKRRREIR*

注: * 代表 I 型 NLS 序列; ** 代表 II 型 NLS 序列。

参与 IFN- γ 信号转导途径的信号蛋白分子主要包括 JAK 酪氨酸蛋白激酶家族中的 JAK1、JAK2 和 STAT 信号蛋白分子家族中的 STAT1。STAT1 同时具有信号转导子和转录激活子的功能,它可在上游 JAK 激酶的催化作用下实现其上 Tyr 残基的磷酸化而活化。活化的 STAT1 可形成二聚体并进入细胞核,与相应的 DNA 反应成分 GAS (IFN-gamma activated sequence) 结合而诱导靶基因表达。虽然已有实验证据表明: STAT1 能够在活化后利用 importin/Ran 途径实现由胞浆到细胞核的转位,但遗憾的是,人们并没有在 STAT1 上寻找到任何符合 NLS 特征的氨基酸序列。但很显然,象 STAT1 这样分子质量约为 90 ku 的信号蛋白分子的入核过程,必须要在功能性 NLS 序列存在的情况下才能够实现。这提示我们:可能存在其他分子能够与 importin 结合并为 STAT1 的入核提供核定位信号。在进一步的深入研究中,人们在 IFN- γ 的 C 端寻找到了一个 I 型 NLS 序列 (RKRKRSR),并且发现在 IFN- γ 与其受体 IFN- γ R α 结合后可在很短时间内观察到 IFN- γ 以及 IFN- γ R α 在核内的大量聚集。基于以上研究结果,人们提出了一种新的 IFN- γ 信号转导模式:即配基与受体结合并内化后,激活的受体可相继结合并活化 JAK1、STAT1,然后这个由配基、受体、激酶和转录因子所形成的大分子复合物在配基 C 端功能性 NLS 的引导下通过 importin/Ran 途径入核,同时被“携带”进细胞核的 STAT1 可发挥相应的转录激活功能。而 JAK 激酶、配基、受体则被重新运输回胞浆或细胞膜表面^[14, 15]。这种由细胞因子或生长因子或其受体参与核转运的情况在同样能够利用 STAT 进行信号传递的胰岛素、生长激素、IL-1 α 前体、IL-5 等中也得到了证实^[13, 16, 17]。

5 信号蛋白分子出核转运简述

信号蛋白分子在被运输到核内发挥了相应的生物学效应后应重新被运输回胞浆。这种能够出核的信号蛋白分子上都有在功能上与 NLS 相对应的特征性氨基酸序列 NES (nuclear export sequence),其特征是富含亮氨酸 (Leu),与 NLS 无任何同源性。能够与 NES 结合的 NES 受体为 CRM1,被称为 exportin。这是一个在功能上与 importin 相对应的核转运蛋白。为出核过程提供能量的供应体仍然是 NPC 上的 GTPase Ran/TC4,这与反方向的入核转运是相同的^[1, 3]。

6 结 语

信号蛋白分子的核转运是信号途径传递过程中非常重要的一个环节。在这方面的研究成果不断丰富了对信号蛋白分子本身作用机制和信号途径整体调控机制的认识。例如在 STAT 家族分子的结构与功能被揭示之初,尽管人们对活化的 STAT 分子如何实现核定位功能完全未知;但很多学者都预言,这类分子的入核和出核转运过程的揭示可能会向人们展示出一种全新的核转运机制。结果经过这几年的不断探索,人们果然发现了象 IL-1 前体、IL-5 和 IFN- γ 这些能够激活 JAK/STAT 途径的细胞因子上,存在有功能性的 NLS 序列并可“携带”相应的 STAT 分子入核^[13~17]。这种所谓的“伴侣机制”的提出是对 JAK/STAT 途径活化分子机制的重要补充。另外,核转运过程的研究也为人们提供了控制细胞信号转导途径激活的另一重要调控点,并可通过对这个调控点的调节而达到控制细胞生存、增殖和凋亡的目的。例如癌基因产物 BCR-ABL 的活化与许多细胞的恶化过程相关。在研究慢性髓系白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) 细胞的生长调控机制过程中,人们发现 BCR-ABL 上同时存在有功能性的 NLS 和 NES 序列。如果 BCR-ABL 位于胞浆,则它可通过自身的 Tyr 激酶活性而引发细胞增殖和抗凋亡效应;但当它转位至细胞核内后,则可导致相反的细胞凋亡效应。因此有学者采用蛋白质分子入核转运促进剂 STI571 和出核转运抑制剂 LMB 联合作用,其结果是导致了 BCR-ABL 在核内的聚集,并诱导 CML 细胞走向凋亡^[18]。以上研究为临床治疗 CML 提供了一个崭新的思路和策略。

参 考 文 献

- 1 Sekimoto T, Yoneda Y. Nuclear import and export of proteins: the molecular basis for intracellular signaling. *Cytok Growth Factor Rev*, 1999, **9** (3/4): 205~ 211
- 2 Pante N, Aebi U. Toward a molecular understanding of the structure and function of the nuclear pore complex. *Int Rev Cytol*, 1995, **162** (B): 225~ 255
- 3 Jans D A, Hassan G. Nuclear targeting by growth factors, cytokines, and their receptors: a role in signaling? *BioEssays*, 1998, **20** (5): 400~ 411
- 4 Pellegrini S, Dusanter-FI. The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur J Biochem*, 1997, **248** (3): 615~ 633
- 5 Baeuerle P A, Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 1994, **12** (4): 141~ 179
- 6 Dingwall C, Laskey R A. Nuclear targeting sequences: a consensus? *Trends Cell Biol*, 1991, **16** (12): 478~ 481
- 7 Song L, Shen B. Does putative nuclear localization sequence in intracellular domain of gp130 possess function of nuclear import? A reply. *Chinese Journal of Cancer*, 2001, **20** (10): 11~ 14
- 8 Gorlich D, Kostka S, Kreft R, *et al.* Two different subunits of importin cooperates to recognize nuclear localization signal and bind them to the nuclear envelope. *Curr Biol*, 1995, **5** (4): 383~ 392
- 9 O'Neill R E, Palese P. NP1, the human homologue of SRP-1, interacts with influenza virus nucleoplasmin. *Virology*, 1995, **206** (1): 116~ 125
- 10 Weis K, Mattaj J W, Lamond A I. Identification of hSRP1 α as a functional receptor for nuclear localization sequence. *Science*, 1995, **268** (5213): 1049~ 1051
- 11 Fontes M R M, The T, Kobe B. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- α . *J Mol Biol*, 2000, **297** (5): 1183~ 1194
- 12 Moore M S, Blobel G. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature*, 1993, **365** (6447): 661~ 663
- 13 Johnson H M, Torres B A, Green M M, *et al.* Cytokine-receptor complexes as chaperon for nuclear translocation of signal transducers. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **244** (3): 607~ 614
- 14 Subramaniam P S, Mujtaba M G, Paddy M P, *et al.* The carboxyl terminus of interferon- γ contains a functional polybasic nuclear localization sequence. *J Biol Chem*, 1999, **274** (1): 403~ 407
- 15 Sekimoto T, Nakajima K, Tachibana T, *et al.* Interferon- γ -dependent nuclear import of STAT1 is mediated by the GTPase activity of Ran/TC4. *J Biol Chem*, 1996, **271** (49): 31017~ 31020
- 16 Wesendorf J H M, Garfinkel S, Zhan X, *et al.* Identification of a nuclear localization sequence within the structure of the human interleukin-1 α precursor. *J Biol Chem*, 1993, **268** (29): 22100~ 22104
- 17 Jans D A, Briggs L J, Gustin S E, *et al.* A function bipartite nuclear localization signal in the cytokine IL-5. *FEBS Letters*, 1997, **406** (3): 315~ 320
- 18 Vigneri P, Wang J Y. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat Med*, 2001, **7** (2): 228~ 234

Mechanism on Nuclear Transport of Signaling Molecules in The Signal Transduction Pathways of Cytokines and Growth Factors*

SONG Lun**, LI Yan, SHEN Bei Fen

(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract Nuclear import and export of signaling molecules is an important step in the signal transduction pathways of cytokines and growth factors. Nuclear localization sequence (NLS) is the specific amino acid sequence on the signaling proteins to be sufficient for their nuclear translocation. In addition, nuclear pore complex (NPC), nuclear transport protein-importin and the energy-providing GTPase-Ran/TC4 are also involved in the nuclear import of the signaling molecules. NLSs are also widely located on the cytokines, growth factors or their receptors, and these ligands or receptors may act as chaperon molecules to assist nuclear translocation of other intracellular signaling proteins through the action of NLS.

Key words nuclear transport, nuclear localization sequence (NLS), importin, Ran/TC4, chaperone mechanism

* This project is supported by the National Natural Science Foundation of China (39925019).

** Corresponding author. Tel: 86-10-66931326, E-mail: lunsong@yahoo.com

Received: July 3, 2001 Accepted: September 12, 2001