

MAPK 的细胞内定位与激活后移位机制*

龚小卫 姜 勇**

(第一军医大学病理生理学教研室, 全军休克微循环重点实验室, 广州 510515)

摘要 信号蛋白的亚细胞定位和激活后移位已成为细胞信号转导研究中的重要内容. MAPK 信号通路是真核细胞中的重要信号转导系统. MAPK 在细胞中有着相对固定的定位, 在适宜的刺激作用下会移位入核并产生相应的生理效应. 目前认为, MAPK 的磷酸化状态及与其他蛋白质, 如上游激酶、磷酸酶和下游底物之间的相互作用, 可能在其特异性定位与激活后移位中起作用. MAPK 的定位与移位机制的阐明, 有助于进一步揭示 MAPK 的生理功能.

关键词 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK), 亚细胞定位, 移位, 磷酸化, 蛋白质-蛋白质相互作用

学科分类号 Q291

信号转导的时空特征, 即信号蛋白的亚细胞定位 (subcellular localization) 和激活后移位 (translocation) 已成为目前细胞信号转导研究最重要的内容之一^[1, 2]. 以往认为, 受体及其他信号蛋白分子大部分都位于原地, 空间的信号转移主要通过第二信使的快速扩散进行. 当前研究则建立了一个完全不同的概念, 即信号蛋白的定位和激活后移位, 以及伴随的与其他蛋白质的可逆性结合, 才是信号在细胞内进行有效传递的关键所在^[2]. 在许多情况下, 信号蛋白需要锚定于适配体蛋白 (adaptor)、细胞骨架及细胞质膜结构, 或与其上游激酶和下游底物进行结合来发挥正常功能^[1, 3]. 信号分子的特异性定位有助于细胞高效经济地完成各种正常功能和病理反应.

MAPK (mitogen-activated protein kinase) 信号转导通路是真核细胞中的一个重要信号系统, 能将多种细胞外刺激产生的信号从细胞膜传递到细胞核内^[4]. MAPK 信号转导通路采用高度保守的三级激酶级联传递信号, 即 MKKK (MAP kinase kinase kinase) → MKK 或 MEK (MAP kinase kinase) → MAPK. 激活的 MAPK 可通过磷酸化转录因子、细胞骨架相关蛋白及酶类等多种底物来调节多种细胞生理过程. 在哺乳动物细胞中, MAPK 分为 4 个亚族, 即细胞外信号调节激酶 (extracellular-signal regulated protein kinase, ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun amino-terminal kinase, JNK)、p38 和 ERK5^[4]. MAPK 家族成员在细胞中都具有特定的定位, 在适宜的刺激下, 多个 MAPK 家族成员都能移位入核. MAPK 的细胞

内定位和激活后移位, 以及对上游激酶和下游底物的选择性作用是激酶级联信号特异性转导的重要机制. 本文主要就 MAPK 家族成员的细胞内定位与移位机制的研究现状予以介绍并展开讨论.

1 MAPK 的亚细胞定位和激活后移位

哺乳动物细胞中研究得最为广泛的 MAPK 是 ERK 亚族成员, 该亚族成员主要在多种生长因子和激素的信号转导中起作用. JNK 通路除了能被生长因子刺激激活外, 还能被多种应激刺激激活, 而 p38 亚族成员则主要对应激和炎症刺激起反应^[4]. Spc1 和 Hog1 分别是裂殖酵母和酿酒酵母中 p38 的对应物. 不同研究者对 ERK1/2、JNK、Spc1 和 Hog1 的研究表明, 这些 MAPK 在静息状态下的亚细胞定位及刺激后的移位具有一定的相似性^[5~8]. 在未受刺激的细胞中, MAPK 主要存在于胞质中, 但核中也有一定的分布. 在受到刺激后, MAPK 迅速而显著地聚积于核中, 并导致相应基因的表达改变. 我们的研究也发现^[9], p38 在细胞中弥散分布, 且在脂多糖 (LPS) 刺激后能迅速移位入核并诱导 TNF- α 的表达. 然而, 这种核移位是一个短暂的过程, 在信号被灭活后 MAPK 将重新分布于胞质中. 当阻断 MAPK 的移位时, 信号的传导也将被阻断, 这表明正常的 MAPK 信

* 国家杰出青年科学基金 (39925014) 和国家自然科学基金重点 (30030060) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 020-61648231, E-mail: yjiang@public.guangzhou.gd.cn

收稿日期: 2002-12-18, 接受日期: 2003-01-28

号转导需要通过其移位来完成。例如，在哺乳动物细胞中，当阻断 ERK1/2 入核时，转录因子 Elk-1 的磷酸化也被阻断，使得相关基因的表达受到抑制，而 ERK1/2 对胞质中底物的激活则不受影响^[6]。

为何 MAPK 受到刺激后其细胞内定位将发生改变？下列几个因素可能在其中起作用：a. 在被磷酸化激活后，MAPK 与某些结合蛋白的亲和力发生改变。b. 与 MAPK 相互作用的某些蛋白质的细胞内定位发生改变。c. 信号通路激活后能诱导基因表达发生改变，从而使胞质的和/或核中的某些与 MAPK 相互作用的蛋白质丰度发生改变。d. 某些蛋白质构型发生变化或形成特殊的信号蛋白复合物，使其与 MAPK 的亲和力发生变化。对于不同 MAPK 家族成员而言，其具体的定位与移位机制可能有所不同。

2 MAPK 移位的分子机制

2.1 MAPK 转运入核的机制

MAPK 单体分子约 40~50 ku，理论上可以通过自由扩散进出核孔。然而，通过这种自由扩散的能力是有限的，进行主动性核转运的成分例如输入素 (importin) /输出素 (exportin) 或 Ran-GTP 循环成分才是影响 MAPK 最终分布的主要因素^[10]。例如，Pim1 是裂殖酵母中对应于小分子 GTP 酶 Ran 的鸟苷酸交换因子 (guanosine exchange factor, GEF)，在 Pim1 缺陷的突变株中，Spc1 不能移位入核，而 Hog1 在核中的聚积

则需要 Ran 的酿酒酵母同源物 Gsp1 和输入素 Nmd5p。尽管 Ran-GTP 酶循环成分和输入素/输出素的活性能影响体内 MAPK 的定位，但实际上所有 MAPK 家族成员都不具有真正的核定位信号 (nuclear localization signal, NLS) /核输出信号 (nuclear export signal, NES)，或者与某种输入素/输出素直接结合^[5]。MAPK 在体内能与多种底物及调节蛋白结合，形成较大的信号复合体，因而可能通过与具有 NLS/NES 的蛋白结合来进/出细胞核。Whitehurst 等^[11]研究发现，ERK2 可通过与核孔素 (nucleoporin) 结合并与核孔复合体 (nuclear pore complex, NPC) 蛋白直接作用而入核。

2.2 磷酸化状态对 MAPK 定位的影响

MAPK 的细胞内定位与其所处的活性状态密切相关。例如，裂殖酵母中 Spc1 的双磷酸化位点中任一个发生突变而不能被磷酸化激活时，其移位入核将被阻断。而且，在含有一个功能性 *spc1*⁺ 拷贝的双倍体细胞中，不能被磷酸化的 Spc1 突变体也不能聚积到核中，同时对刺激也不起反应。Seta 等^[12]利用正与异三聚体 G 蛋白偶联的血管紧张素 II 1 型受体突变体激活 ERK 后，活化的 ERK 仍能磷酸化胞质中的底物，但不能移位入核，说明 MAPK 被磷酸化激活的方式 (异三聚体 G 蛋白依赖的和非依赖的) 也能影响其移位。利用无催化活性的突变 Hog1 的研究则阐明，Hog1 的核移位并不依赖于激酶活性，说明在决定核定位中起关键作用的不是激酶活性本身，而是 MAPK 的磷酸化^[5]。

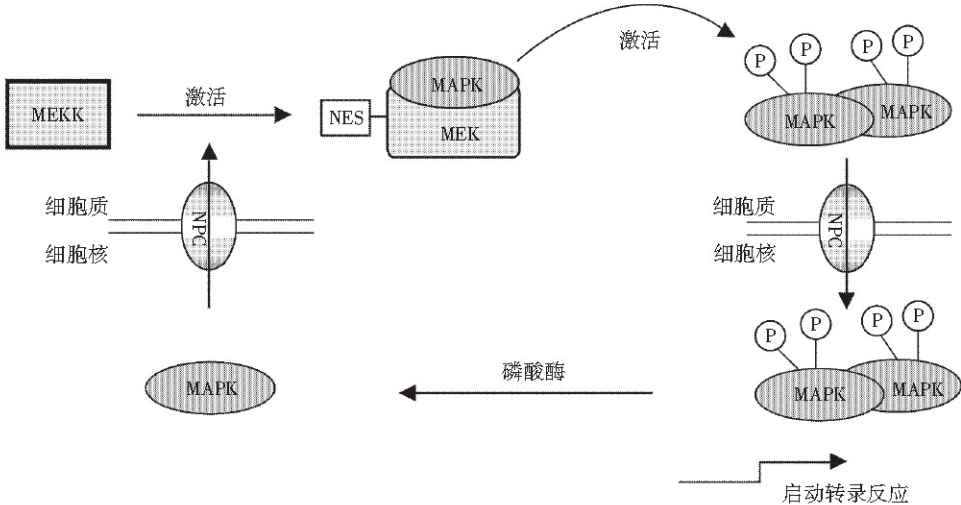


Fig. 1 Phosphorylation of ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation

图 1 ERK2 的磷酸化促进其二聚体化及核移位

在哺乳动物细胞中, ERK2 的磷酸化能诱导自身形成同二聚体, 且只发生磷酸化但没有二聚体化的 ERK2 突变体不能入核, 说明 ERK2 的磷酸化及其触发的二聚体化是其移位入核的前提条件^[7] (图 1). 磷酸化诱导的二聚体化促进核移位并非 MAPK 的独特性质, 在 STAT 转录因子家族成员中也是如此, 这可能是调控多种蛋白质亚细胞定位的一种重要方式.

MAPK 的磷酸化不但能促使其移位入核, 而且还能显著抑制其出核. 例如, 显微注射研究表明, 磷酸化的 ERK2 较未磷酸化的 ERK2 输出速率慢. 另外, 在酿酒酵母中, 当 Hog1 过度表达时, 能被磷酸化激活并聚集于核中, 而用蛋白质合成抑制剂处理酿酒酵母后, 并不影响 Hog1 在信号灭活后返回胞质的速率, 说明这是对 Hog1 的核输出进行调节的结果, 而与其重新合成无关.

2.3 蛋白质-蛋白质相互作用与 MAPK 的定位

MAPK 与某些胞质蛋白或核蛋白之间的相互作用也能显著影响其细胞内定位. MAPK 并不具备特异性的锚定蛋白. 事实上, MAPK 的细胞内分布反映的是与细胞内多种蛋白质相互作用的总结果.

2.3.1 与上游激酶的作用: 在酵母和哺乳动物细胞的研究中都发现 MAPK 与 MKK 的相互作用对其定位有着相当大的影响. 例如, 在哺乳动物细胞中, MEK 与未磷酸化的 ERK1/2 紧密结合, 并通过 N 端的一个富含亮氨酸的 NES 及 C 端的第 330~379 位氨基酸残基将其锚定于胞质中^[13], 当 ERK1/2 被磷酸化激活后将 MEK 中解离出来并移位入核 (图 1). MEK 的 ERK1/2 结合结构域的过度表达可以阻断丝裂原诱导的 ERK1/2 移位入核, 而 Wolf 等^[14] 则发现, ERK2 与 MEK 的解离依赖于 Loop 12 中第 176~181 位氨基酸残基以及双磷酸化位点之一的酪氨酸. 在存在 Ran 的情况下, MEK 的 NES 可与核输出受体 Crm1 结合并导致 MEK 出核. 到达胞质后, Crm1/MEK 复合体在存在 Ran-GDP 的情况下解离. 根据上述发现, 有人提出 MEK 在细胞核与细胞质之间进行穿梭, 并催化未磷酸化的 ERK 从核中输出^[15]. 但显然 MKK 并不能完全左右 MAPK 的定位. 例如, 在删除 Wis1 的裂殖酵母中, Spc1 不会产生组成性核移位. 在 Spc1 移位入核时, 其上游激活因子 Wis1 仍位于胞质中^[5]. 由于 Spc1 在 *wis1* 敲除的细胞中不能聚积于核, 因而 Wis1 不太可能作为 Spc1 的

胞质锚定蛋白而发挥作用. 在大多数细胞中, MAPK 都较其对应的 MKK 丰富, 这也说明在未受刺激的细胞中, 单独的 MKK 并不足以使 MAPK 滞留于胞质.

2.3.2 与磷酸酶的相互作用: 由于 MAPK 在被去磷酸化后返回到胞质中, 因而有人提出 MAPK 的出核需要其去磷酸化. MAPK 的去磷酸化主要由 MAPK 磷酸酶完成. PTP-SL 是一种整合膜蛋白, 能被活化的 ERK2 激活, 随后去磷酸化并灭活 ERK2. PTP-SL 中一个保守的含有 16 个氨基酸的激酶作用基序 (kinase interaction motif, KIM) 不但能促进 PTP-SL 对 ERK2 的去磷酸化, 而且还可作为 ERK2 的胞质锚定部位而发挥作用^[16]. 另外, 蛋白激酶 A 对 KIM 的磷酸化能抑制 PTP-SL 在体外与 ERK2 的结合, 同时还能抑制 PTP-SL 依赖的体内 ERK2 在胞质中的分布, 说明其他信号通路也可通过调节 ERK 与锚定蛋白的相互作用而影响其细胞内定位^[16].

2.3.3 与下游底物的作用: 当 Spc1 被激活后, 能转而磷酸化并激活 Atf1. Atf1 是一种转录因子, 是人 ATF2 的同源物. 在缺乏 Atf1 或其转录共激活因子 Per1 的细胞中, Spc1 不能在核中发生聚集. Atf1 在体外能与 Spc1 结合, 说明 Atf1 可能作为 Spc1 的一种核系链蛋白而发挥作用. 缺乏 Atf1 的突变体对于许多应激诱导基因产物的表达缺陷, 其中一些可能也能影响 Spc1 的定位. 尽管 Atf1 与 Spc1 之间的相互作用对于 Spc1 的磷酸化状态不敏感, 但在暴露于应激后, Atf1 的 mRNA 和蛋白质水平都增加. 因而, Atf1 丰度的增加可能能在 Spc1 的核聚积中起作用.

MAPK 激活蛋白激酶 2 (MAP kinase-activated protein kinase 2, MAPKAP-K2) 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员, 在被 p38 磷酸化激活后, 转而激活低分子质量热休克蛋白 (small heat shock protein) Hsp27, 从而介导细胞骨架重构. MAPKAP-K2 活性的变化能反过来影响 p38 的定位. MAPKAP-K2 被激活后将暴露出 NES 并移位出核, 且与 p38 共表达时将导致 p38 滞留于胞质中, 说明 MAPKAP-K2 具有将 p38 锚定于胞质中的作用.

2.3.4 与其他蛋白质的作用: 除了 MAPK 通路本身的一些蛋白质能影响 MAPK 的定位外, 其他一些蛋白质也能在调节 MAPK 的定位与激活后移位中起一定的作用. 例如, Tohgo 等^[17] 发现 β -

arrestin 不但能增强 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptor, GPCR) 介导的 ERK 激活, 还能通过与磷酸化的 ERK 结合而使其滞留于胞质中, 从而抑制 ERK 依赖的转录。

2.3.5 MAPK 定位调节的整合模型: MAPK 在细胞中的定位与移位是多种因素共同作用的结果。在未受刺激时, MAPK 处于无活性状态, 主要位于胞质中, 这是由于未磷酸化的 MAPK 与某些胞质蛋白具有高亲和力相互作用, 而在核中与 MAPK 相互作用的蛋白质含量较低或与 MAPK 相互作用的亲和力较低的缘故。MAPK 被磷酸化激活后与胞质蛋白的亲和力下降, 而与 MAPK 具有高亲和力的核蛋白丰度及亲和力增加, 从而导致 MAPK 移位入核。在信号被灭活后, MAPK 被去磷酸化, 与胞质蛋白的相互作用增加及失去高亲和力的核结合位点, 因而返回到胞质中^[5]。

3 展 望

信号分子的定位与激活后移位是信号转导的重要方式。MAPK 信号转导系统在维持细胞正常的生理功能中具有重要作用, 其所处的活性状态以及与多种不同的核蛋白和胞质蛋白之间的相互作用, 决定了在细胞内的定位。但由于实验方法的差异和技术手段的限制, 不同研究者对于不同 MAPK 家族成员定位与移位机制的研究结果大相径庭。进一步深入研究 MAPK 的定位与移位机制, 探讨产生不同研究结果的可能原因, 必将对彻底阐明 MAPK 的生理功能有所帮助。

参 考 文 献

- Mochly-Rosen D. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science*, 1995, **268** (5208): 247~251
- Teruel M N, Meyer T. Translocation and reversible localization of signaling proteins: a dynamic future for signal transduction. *Cell*, 2000, **103** (2): 181~184
- Downward J. The ins and outs of signalling. *Nature*, 2001, **411** (6839): 759~762
- Kyriakis J M, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, 2001, **81** (2): 807~869
- Cyber M S. Regulation of nuclear localization during signaling. *J Biol Chem*, 2001, **276** (24): 20805~20808
- Aplin A E, Stewart S A, Assoian R K, *et al.* Integrin-mediated adhesion regulates ERK nuclear translocation and phosphorylation of Elk-1. *J Cell Biol*, 2001, **153** (2): 273~281
- Khokhlatchev A V, Canagarajah B, Wilsbacher J, *et al.* Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell*, 1998, **93**: 605~615
- González M V, Jiménez B, Berciano M T, *et al.* Glucocorticoids antagonize AP-1 by inhibiting the activation/phosphorylation of JNK without affecting its subcellular distribution. *J Cell Biol*, 2000, **150** (5): 1199~1207
- 姜 勇, 刘爱华, 黄巧冰, 等. p38 MAPK 参与 LPS 诱导 RAW 细胞 TNF- α 基因表达的调控. *生物化学与生物物理学报*, 1999, **31** (1): 9~15
- Jiang Y, Liu A H, Huang Q B, *et al.* *Acta Biochim Biophys Sin*, 1999, **31** (1): 9~15
- Matsubayashi Y, Fududa M, Nishida E. Evidence for existence of a nuclear pore complex-mediated, cytosol-independent pathway of nuclear translocation of ERK MAP kinase in permeabilized cells. *J Biol Chem*, 2001, **276** (45): 41755~41760
- Whitehurst A W, Wilsbacher J L, You Y, *et al.* ERK2 enters the nucleus by a carrier-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (11): 7496~7501
- Seta K, Nanamori M, Modrall J G, *et al.* AT1 receptor mutant lacking heterotrimeric G protein coupling activates the Src-Ras-ERK pathway without nuclear translocation of ERKs. *J Biol Chem*, 2002, **277** (11): 9268~9277
- Cha H, Lee E K, Shapiro P. Identification of a C-terminal region that regulates mitogen-activated protein kinase kinase-1 cytoplasmic localization and ERK activation. *J Biol Chem*, 2001, **276** (51): 48494~48501
- Wolf I, Rubinfeld H, Yoon S, *et al.* Involvement of the activation loop of ERK in the detachment from cytosolic anchoring. *J Biol Chem*, 2001, **276** (27): 24490~24497
- Adachi M, Fududa M, Nishida E. Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK) -dependent active transport mechanism. *J Cell Biol*, 2000, **148** (5): 849~856
- Blanco-Aparicio C, Torres J, Pulido R. A novel regulatory mechanism of MAP kinases activation and nuclear translocation mediated by PKA and the PTP-SL tyrosine phosphatase. *J Cell Biol*, 1999, **147** (6): 1129~1135
- Tohgo A, Pierce K L, Choy E W, *et al.* β -arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J Biol Chem*, 2002, **277** (11): 9429~9436

Mechanisms of The Subcellular Localization and Stimuli-induced Translocation of MAP Kinases*

GONG Xiao-Wei, JIANG Yong**

(Department of Pathophysiology and Key Laboratory for Shock and Microcirculation of PLA,
The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract The subcellular localization and translocation of signaling proteins have risen large interest in the study of cellular signal transduction. MAP kinase pathways are key signaling systems in eukaryotic cells. MAP kinases have relatively specific localization in cells, and translocate into nucleus upon appropriate stimuli, leading to consequent physiological effects. It has been shown that the phosphorylation state of MAPKs as well as the interactions between MAP kinases and other proteins such as the upstream kinases, phosphatases, and downstream substrates may play a role in their specific localization and translocation. The elucidation of the mechanisms of localization and translocation of MAP kinases will be helpful to understand their *in vivo* functions.

Key words mitogen-activated protein kinase, subcellular localization, translocation, phosphorylation, protein-protein interaction

* This work was supported by grants from The National Science Fund for Distinguished Young Scholars (39925014) and The Key of National Natural Science Foundation of China (30030060).

** Corresponding author. Tel: 86-20-61648231, E-mail: yjiang@public.guangzhou.gd.cn

Received: December 18, 2002 Accepted: January 28, 2003