

## cGAMP: 一种新的哺乳动物第二信使\*

郭晓强<sup>1, 2)\*\*</sup> 田占涛<sup>1)\*\*</sup> 李娜<sup>3)</sup> 王越甲<sup>1)</sup> 段相林<sup>1)\*\*\*</sup>

<sup>(1)</sup>河北师范大学生命科学学院铁代谢分子生物学研究室, 石家庄 050016;

<sup>(2)</sup>解放军白求恩医学院生化教研室, 石家庄 050081; <sup>(3)</sup>唐山职业技术学院, 唐山 063000)

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00072

第二信使是指在第一信使(信号分子)诱导下生成, 并在细胞内通过激活下游靶分子发挥中介作用的小分子物质, 包括 cAMP (cyclic adenosine monophosphate)、cGMP (cyclic guanosine monophosphate)、IP<sub>3</sub> (inositol 1, 4, 5 triphosphate) 和 Ca<sup>2+</sup> 等. cAMP 是第一个鉴定的第二信使, 在此基础上萨瑟兰(Earl Wilbur Sutherland Jr)提出第二信使假说, 极大地拓展了对信号转导的理解, 萨瑟兰也因此荣获诺贝尔奖<sup>[1]</sup>. cAMP 和 cGMP 作为第二信使在包括低等到高等生物中都发挥着重要的信号传递作用, 而在细菌等低等生物中还存在 c-di-GMP 和 c-di-AMP, 甚至 cGAMP (cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate) 等环二核苷酸第二信使分子<sup>[2-3]</sup>. 最新研究表明, 哺乳动物中也存在 cGAMP 第二信使, 该分子在天然免疫信号通路中发挥着重要作用<sup>[4]</sup>.

### 1 哺乳动物中 cGAMP 的生成

已知细胞质 DNA 可启动 I 型干扰素( $\alpha$  和  $\beta$  干扰素)产生, 该过程涉及多条通路<sup>[5]</sup>, 其中之一由干扰素基因激活蛋白(stimulator of IFN genes, STING)介导完成<sup>[6]</sup>, 但对 DNA 激活 STING 的分子机制尚有许多问题待阐明, 最关键问题是 STING 如何感知双链 DNA<sup>[5]</sup>. Wu 等<sup>[7]</sup>首先对 STING 低表达细胞系进行 DNA 转染处理, 再将细胞破碎获得细胞质加到经过通透性处理的巨噬细胞系, 最终激活 I 型干扰素反应, 这意味着 DNA 并非直接激活 STING, 而是在细胞质中产生 STING 激活物质. 由于已鉴定的多种 STING 激活因子均为蛋白质, 于是对该细胞质进行 95°C 和酶处理, 以去除其中

的 DNA、RNA 和蛋白质, 但仍可检测到明显的 STING 激活效应, 暗示该 STING 激活物质既非核酸也非蛋白质. 接下来利用亲和层析方法纯化得到 STING 激活物质, 质谱分析发现该化合物分子质量为 675, 正好为 c-di-AMP(659)和 c-di-GMP(691)分子质量的平均值, 因此推测该物质为 cGAMP (图 1), 进一步对 STING 激活物质和化学合成的 cGAMP 进行质谱分析证明其为同一物质.

在哺乳动物细胞内, cGAMP 可由 cGAMP 合成酶(cGAMP synthetase, cGAS)催化生成. 人的 cGAS 又名 MB21D1 (MAB-21 domain-containing protein 1) 和 C6orf150 (chromosome 6 open reading frame 150), 基因定位于第 6 条染色体(6q13), 由于拥有 MAB-21 (male abnormal 21) 结构域, 故得名 MB21D1<sup>[8]</sup>. MAB-21 结构域由大约 360 个氨基酸组成, 最早于线虫中发现<sup>[9]</sup>, 后来在斑马鱼、小鼠和人等<sup>[10]</sup>鉴定成功, 拥有该结构域的蛋白主要包括 Mab-21 蛋白和 Mab-21 样蛋白, 这些蛋白质在结构上高度保守, 主要参与胚胎发育和细胞分化过程.

人的 cGAS 由 522 个氨基酸残基构成, C 端含有典型的 MAB-21 结构域. Sun 等<sup>[11]</sup>的研究表明, cGAS 主要定位于细胞质, 序列分析表明 cGAS 拥有一个与寡腺苷酸合成酶(oligoadenylate synthase, OAS)催化结构域同源的结构域, 此结构域主要存

\* 国家自然科学基金资助项目(30870265).

\*\* 共同第一作者.

\*\*\* 通讯联系人.

Tel: 0311-86267215, E-mail: xl\_duan0311@163.com

收稿日期: 2013-02-24, 接受日期: 2013-04-10

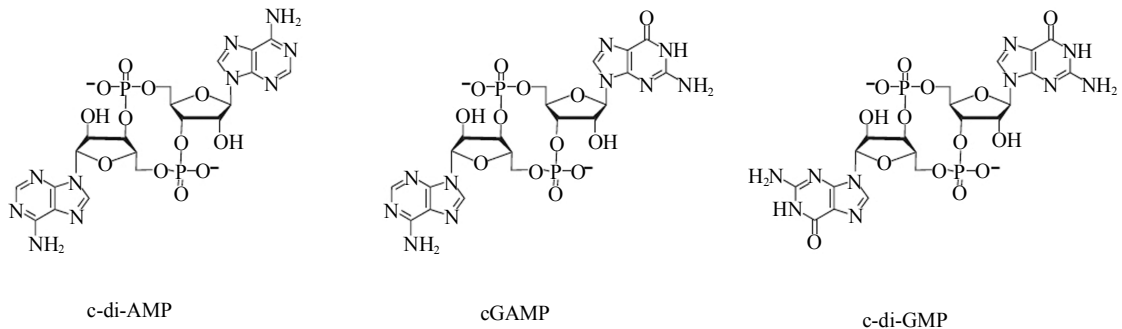


Fig. 1 The chemical structure of three cyclic dinucleotides

图 1 三种环二核苷酸化学结构

在于核苷酸转移酶家族, 而该家族包括腺苷酸环化酶等众多成员. 进一步实验证实 cGAS 拥有腺苷酸环化酶活性, 可催化 1 分子 ATP 和 1 分子 GTP 生成 1 分子 cGAMP, 同时释放 2 分子焦磷酸(图 2). cGAS 酶活性受到 DNA 调节, DNA 转染和 DNA 病毒感染均可激活 cGAS, 但 RNA 无效. 序列分析和初步试验表明, cGAS 的 N 端拥有一个或多个 DNA 结合位点, 可与无序列特异性的外源双链 DNA(如 DNA 病毒、逆转录病毒、细菌和寄生虫等携带的 DNA)或内源双链 DNA(自身产生进入细胞质的 DNA)结合而诱导 cGAMP 生成启动免疫应答, 以抵御微生物感染, 但也可造成自身免疫性疾病的发生.

通过 STING 传递信号. 不表达 STING 细胞中转入 STING 基因再用 cGAMP 处理也可诱导 I 型干扰素反应; 表达 STING 细胞中 STING 含量降低显著抑制 cGAMP 的诱导效应; 体外实验进一步证明 cGAMP 可与 STING 直接结合<sup>[7]</sup>. 结合 cGAMP 的 STING 主要通过激活 TANK- 结合激酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1)而促进干扰素调节因子 3(IFN regulatory factor 3, IRF3)磷酸化和二聚化<sup>[7, 16-17]</sup>, 亦可能激活 IKK(IκB kinase)而促进 NF-κB(nuclear factor κB)磷酸化<sup>[4-5]</sup>. 磷酸化的 IRF3 和 NF-κB 进入细胞核诱导干扰素和相关细胞因子表达, 最终引起免疫应答的发生(图 3)<sup>[4]</sup>.

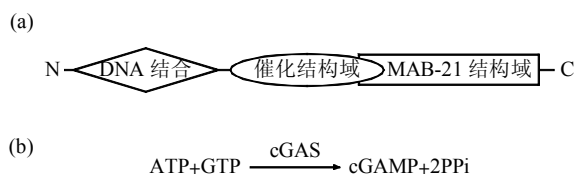


Fig. 2 The structure and catalytic role of cGAS

图 2 cGAS 的结构与功能

(a) 人 cGAS 蛋白结构示意图. (b) cGAS 催化的反应.

## 2 哺乳动物 cGAMP 的生物学作用

cGAMP 可通过结合 STING 进而激活下游分子. STING 是一种定位于内质网的跨膜蛋白<sup>[12]</sup>, 已证明可与细菌环二核苷酸第二信使 c-di-GMP 结合而激活<sup>[13-15]</sup>, Wu 等<sup>[7]</sup>则用三个实验证实 cGAMP 也

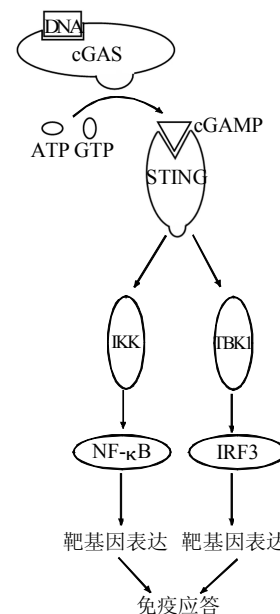


Fig. 3 The model of cGAMP biological function as second messenger<sup>[4]</sup>

图 3 cGAMP 第二信使作用模式图<sup>[4]</sup>

### 3 研究意义和展望

DNA 诱导 I 型干扰素生成机制是天然免疫研究领域的热点之一<sup>[18-19]</sup>, 近几年已先后鉴定出多种细胞质 DNA 感应蛋白, 包括 DAI (DNA-dependent activator of IFN-regulatory factor)、DDX41 (DEAD box polypeptide 41)、IFI16 (interferon inducible protein 16)<sup>[20]</sup>和 AIM2(absent in melanoma 2)<sup>[21]</sup>等. cGAS 作为一种新型细胞质 DNA 感应蛋白的发现, 一方面拓展了对 DNA 诱导的天然免疫机制的理解, 另一方面还提供了新的机制. 和其他 DNA 感应蛋白不同的是, cGAS 在结合 DNA 后并不直接激活靶蛋白 STING, 而是通过催化生成第二信使 cGAMP 实现激活效应(图 3), 这种新模式将对进一步理解天然免疫具有重要益处. 哺乳动物第二信使 cGAMP 的发现也更新了对真核生物信号通路的认识, 破除了环二核苷酸只存在于细菌中的概念<sup>[22]</sup>.

目前, 对第二信使 cGAMP 作用和功能的理解还非常有限, 尚有多问题亟待解决. 哺乳动物中是否和细菌类似还存在 c-di-GMP 和 c-di-AMP 第二信使? 细胞自身产生的 cGAMP 和细菌产生的环二核苷酸在调节 STING 活性时如何相互影响? cGAMP 除参与天然免疫信号途径外是否尚有其他生理作用? DDX41 是一种哺乳动物解旋酶, 除可识别 DNA 激活 STING 外<sup>[23]</sup>, 还可与细菌 c-di-GMP 和 c-di-AMP 结合而激活 I 型干扰素免疫反应<sup>[24-25]</sup>, 因此, DDX41 与哺乳动物 cGAMP 及 cGAS 的关系也是需阐明的问題之一. 此外, cGAS 感知细胞质 DNA 和催化 cGAMP 生成的结构基础也是重要研究目标. 这些问题的深入研究将丰富对感染性疾病和自身免疫性疾病的理解和认识, 对相关免疫治疗药物开发具有重要的推动作用.

### 参 考 文 献

- [1] 郭晓强. 萨瑟兰第二信使假说的科学贡献. 中华医史杂志, 2007, **37**(2): 94-97  
Guo X Q. Chin J Med Hist, 2007, **37**(2): 94-97
- [2] Sondermann H, Shikuma N J, Yildiz F H. You've come a long way: c-di-GMP signaling. Curr Opin Microbiol, 2012, **15**(2): 140-146
- [3] Davies B W, Bogard R W, Young T S, et al. Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for *V. cholerae* virulence. Cell, 2012, **149**(2): 358-370
- [4] O'Neill L A. Immunology. Sensing the dark side of DNA. Science, 2013, **339**(6121): 763-764
- [5] Ishikawa H, Barber G N. The STING pathway and regulation of innate immune signaling in response to DNA pathogens. Cell Mol Life Sci, 2011, **68**(7): 1157-1165
- [6] Ishikawa H, Ma Z, Barber G N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. Nature, 2009, **461**(7265): 788-792
- [7] Wu J, Sun L, Chen X, et al. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. Science, 2013, **339**(6121): 826-830
- [8] Schoggins J W, Wilson S J, Panis M, et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. Nature, 2011, **472**(7344): 481-485
- [9] Chow K L, Hall D H, Emmons S W. The mab-21 gene of *Caenorhabditis elegans* encodes a novel protein required for choice of alternate cell fates. Development, 1995, **121**(11): 3615-3626
- [10] Margolis R L, Stine O C, McInnis M G, et al. cDNA cloning of a human homologue of the *Caenorhabditis elegans* cell fate-determining gene mab-21: expression, chromosomal localization and analysis of a highly polymorphic (CAG)<sub>n</sub> trinucleotide repeat. Hum Mol Genet, 1996, **5**(5): 607-616
- [11] Sun L, Wu J, Du F, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. Science, 2013, **339**(6121): 786-791
- [12] Ishikawa H, Barber G N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. Nature, 2008, **455**(7213): 674-678
- [13] Burdette D L, Monroe K M, Sotelo-Troha K, et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. Nature, 2011, **478**(7370): 515-518
- [14] Yin Q, Tian Y, Kabaleeswaran V, et al. Cyclic di-GMP sensing via the innate immune signaling protein STING. Mol Cell, 2012, **46**(6): 735-745
- [15] Ouyang S, Song X, Wang Y, et al. Structural analysis of the STING adaptor protein reveals a hydrophobic dimer interface and mode of cyclic di-GMP binding. Immunity, 2012, **36**(6): 1073-1086
- [16] Tanaka Y, Chen Z J. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. Sci Signal, 2012, **5**(214): ra20
- [17] Bowie A. The STING in the tail for cytosolic DNA-dependent activation of IRF3. Sci Signal, 2012, **5**(214): pe9
- [18] Vilaysane A, Muruve D A. The innate immune response to DNA. Semin Immunol, 2009, **21**(4): 208-214
- [19] Barber G N. Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses. Curr Opin Immunol, 2011, **23**(1): 10-20

- [20] Keating S E, Baran M, Bowie A G. Cytosolic DNA sensors regulating type I interferon induction. *Trends Immunol*, 2011, **32**(12): 574-581
- [21] 郭晓强, 李文婕, 辛启亮. AIM2: 一种先天免疫系统中的细胞质双链 DNA 感应蛋白. *生命的化学*, 2009, **29**(5): 683-686
- Guo X Q, Li W J, Xin Q L. *The Chemistry of Life*, 2009, **29**(5): 683-686
- [22] McWhirter S M, Barbalat R, Monroe K M, *et al.* A host type I interferon response is induced by cytosolic sensing of the bacterial second messenger cyclic-di-GMP. *J Exp Med*, 2009, **206** (9): 1899-1911
- [23] Zhang Z, Yuan B, Bao M, *et al.* The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat Immunol*, 2011, **12**(10): 959-965
- [24] Parvatiyar K, Zhang Z, Teles R M, *et al.* The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. *Nat Immunol*, 2012, **13**(12): 1155-1161
- [25] Bowie A G. Innate sensing of bacterial cyclic dinucleotides: more than just STING. *Nat Immunol*, 2012, **13**(12): 1137-1139