

POU 蛋白调节中枢神经系统发育

张 力 贾弘禔

(北京医科大学生物化学教研室, 北京 100083)

摘要 POU 蛋白是一组 DNA 特异的转录调节因子, 属同源异形序列超家族. 发育过程中, POU 蛋白编码基因在中枢神经系统各部位的时空性表达决定神经细胞的发育与分化.

关键词 POU 蛋白, 转录调节因子, 神经系统发育与分化

胚胎发育学及分子生物学研究证明, 生物体不同细胞表型与特定基因的时间、空间顺序表达有关. 例如, 果蝇机体的发育就是由一些同源异形选择基因 (homeotic selector gene) 的表达产物决定的^[1]. 这些基因编码的蛋白质都是转录调节因子, 具有共同的 DNA 结合区, 即同源异形序列 (homeodomain, homeobox, HD)^[2], 它们构成了 HD 超家族. 含 POU 结构的蛋白是一类 DNA 序列特异的结合蛋白, 属 HD 超家族中的一个家族. 其 POU 区是转录调节因子中 DNA 结合区的重要结构形式之一^[3], 因见于 Pit-1 (存在于大鼠垂体的一种转录调节因子)、Oct-2 (B 淋巴细胞中的转录调节因子) 及 Unc-86 (线虫发育调节因子) 等, 故称 POU 区蛋白 (POU-domain protein) 或 POU 蛋白. 哺乳类动物和线虫突变型细胞的特异基因表达研究证明, 很多 POU 蛋白与神经系统发育有关.

1 POU 区的结构

根据 Pit-1, Oct-1 和 Oct-2 的 cDNA 演绎的氨基酸序列表明, POU 蛋白的 DNA 结合区亦即 POU 区, 由 147—156 个氨基酸组成; 该区又可分为 POU 特异区 (POU_S) 和 POU 同源异形区 (POU_{HD}) (图 1). N 端的 POU_S 由 69—78 个氨基酸组成, 其中有 48 个保守残基. POU_S 含两个类似的螺旋结构: POU_S-A 和 POU_S-B. POU_S 和 POU_{HD} 之间有一段长度可

变的间隔区, 含 14—25 个氨基酸残基. POU_{HD} 不仅在 POU 家族、而且在 HD 超家族成员中均表现高度相关性和一致性, 在组成 POU_{HD} 的 60 个氨基酸残基中有 32 个保守残基. POU_{HD} 含 3 个相间的螺旋结构. 与原核生物 λ 阻遏物的螺旋-转角-螺旋 (HTH) 结构极其相似^[4]; 组成第三个螺旋的氨基酸残基极端保守, 几乎所有 POU 家族蛋白都含有 RVWFCN 序列. 在 POU_{HD} 的 N 端和 C 端各有一组保守的碱性氨基酸残基: N 端 8 个残基中有 5—6 个碱性残基, C 端 7 个中有 4—5 个, 这些碱性残基对于 POU 蛋白的 DNA 结合功能及转录激活是必不可少的. 同样, POU_S N 端 7 个保守残基中也有 4—5 个碱性残基.

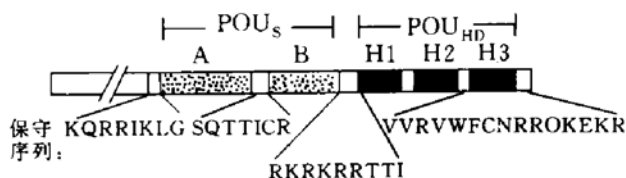


图 1 POU 蛋白的结构

根据 POU 区的全部氨基酸序列同源程度, 可将 POU 蛋白分为 POU-I—POU-V 五组. 居同一组内的核内因子, 其连接 POU_S 和 POU_{HD} 的间隔区具有明显的保守性. 但在 POU 区以外, 所有 POU 家族蛋白均表现明显

差异,即有一段富含特异氨基酸残基的区域,或为丝氨酸-苏氨酸富含区(Pit-1, Oct-1 及 Oct-2),或为谷氨酰胺富含区(Brn-2, Oct-1 及 Oct-2),或为甘氨酸富含区(Tst-1/SCIP/Oct-6).

2 POU 区的功能

Pit-1, Oct-1 的一系列突变研究表明,POU_S 和 POU_{HD}对于高效、特异的 DNA 结合都是必不可少的. POU_S 可提高 Pit-1 对其特异识别序列亲和力 1000 倍,对转录因子高亲和性位点与特异 DNA 的结合极为重要^[5,6];它也是依赖 DNA 的蛋白质-蛋白质相互作用所必需的^[5]. POU_{HD}对 DNA 结合同样至关重要^[7]. 当病毒 α TIF/VP16 蛋白与 Oct-1 的同源序列相互作用时涉及 POU_{HD},提示 POU_{HD}也参与蛋白质-蛋白质相互作用^[8,9]. 将 POU_S N 端或 POU_{HD} N, C 端任一区域内的碱性氨基酸突变,均会消除 POU 蛋白与 DNA 的高效结合^[5].

经典的 HD 超家族蛋白的 DNA 结合位点通常为 A-T 富含区,而 POU 蛋白的结合位点可以是 (A/T)₆₋₁₂ TTTGCAT, (A/T)₆₋₁₂ TATNCAT 或其衍生序列^[3]. 当 POU 蛋白与 DNA 相互作用时,POU_S 和 POU_{HD}分别与 TATNCAT 和 A-T 富含区结合.

3 POU 蛋白的二聚化作用

研究资料揭示,POU 蛋白家族中许多成员可以单体形式与其识别的 DNA 元件结合.但是,Pit-1, Oct-2 和 Cfl-a 在与某些顺式元件结合时,却表现为协同的、依赖 DNA 的蛋白质-蛋白质相互作用,这种协同相互作用可增强转录活性^[5,10,11]. 对 Oct-2 和 Pit-1 的研究表明,蛋白质之间的协同相互作用——二聚化与 POU_S 有关. POU_S 不仅可介导依赖 DNA 的蛋白质-蛋白质相互作用、形成同质二聚体,而且对同一细胞中同时表达的 POU 家族蛋白之间异质二聚体形成也具有重要作用^[11]. Oct-1 可通过 POU_{HD}第二个螺旋中某些氨基酸残基与

疱疹病毒 VP16 基因产物结合,激活病毒早期转录^[8,12],说明蛋白质之间的相互作用也可由 POU_{HD}介导. Oct-2 POU_{HD}中第二个螺旋结构中 3 个氨基酸突变可降低与 VP16 的结合也支持这一结论. POU_{HD}介导二聚体形成在最近的化学交联实验中也得到证实:将脯氨酸残基代入 Cfl-a 的 POU_{HD}第二个螺旋或 I-POU 的 POU_{HD}第一或第二个螺旋结构会阻止异质二聚体的形成^[7].

在哺乳类动物和果蝇也曾发现不依赖 DNA 的 POU 家族蛋白之间的相互作用,其结果是阻止特异的正性 POU 调节蛋白与 DNA 的结合^[7]. 这样,在同一组织细胞中同时表达的各种 POU 蛋白即可通过相互间结合反应,控制一组细胞的发育和成熟,表达特定表型.

4 POU 蛋白的表达

神经细胞表型及神经细胞间相互关系的建立是脑发育的特点,涉及一系列调节因子基因连续被活化的过程.这个过程与果蝇身体各部分发育十分相似^[13].

根据序列同源程度及性质将 POU 家族蛋白分为 5 组:POU-I (Pit-1), POU-II (Oct-1, Oct-2), POU-III (Brn-1, Brn-2, Tst-1 及 Cfl-a), POU-IV (Brn-3, Unc-86 及 I-POU) 和 POU-V (Oct-3/4). 利用免疫组化、组织原位杂交及核酸酶保护实验等检测了大鼠中枢神经系统发育过程 5 种 POU 基因的表达^[3],发现神经系统的某些部位只表达 POU 家族蛋白中之一,而有些部位则是多种蛋白同时表达.特定部位不同细胞表达的 POU 蛋白也不完全相同,如小脑 Purkinje 细胞表达 Brn-1 和 Brn-2,而颗粒细胞则表达 Tst-1, Oct-1 和 Oct-2;在上交叉核只表达 Oct-2,在中脑果体可同时检测到 Brn-1, Brn-2, Brn-3, Tst-1 及 Oct-1 的表达. POU 蛋白在脑组织分布极广,其表达表现为复杂的时间性.哺乳类动物 POU 蛋白不仅在发育中的神经管表达,而且也出现在发育成熟的前脑和中脑,这些蛋白质对脑组织相应的神经细胞表型的确立起重要作用.

用. POU 蛋白决定神经表型的作用是通过转录激活而实现的. 果蝇胚胎发育过程表达几种 POU 蛋白, 1-POU 蛋白于胚带缩短 (Campos-Ortega 和 Hartenstein 定义的发育阶段 13) 后出现于食管上神经节、腹神经索的神经元内, 表现为严格的神经元特异性. Cf1-a 表达虽与果蝇机体发育有关, 但沿胚胎腹中线分布的细胞也表达 Cf1-a, 这些细胞属中、外胚层, 最后转变为神经元神经胶质细胞.

POU 基因表达受其它发育调节机制影响. 果蝇胚胎发育早期, Oct-3/4 在胚胎干细胞表达; 当细胞受视黄酸作用时, 会明显抑制 Oct-3/4 的表达. 视黄酸对 Oct-3/4 和 Tst-1 的负性调节作用证明 POU 蛋白表达与细胞早期发育事件有关^[14]. Pit-1 基因结构与机能分析揭示, 该基因 CAP 位点附近有两个 Pit-1 结合调节元件——CAP 5' 侧的正性调节元件和 3' 侧的负性调节元件. 前者与 Pit-1 亲合性强, 后者弱. 这样, 低水平的 Pit-1 只结合 5' 侧的正性调节元件, 使转录激活; 只有当 Pit-1 水平高达一定程度, 才会结合 3' 侧的低亲合位点, 抑制转录. Pit-1 基因正、负调节就是靠这一机制维持的^[15].

5 POU 蛋白决定神经细胞分化

线虫发育研究表明, Unc-86 的定点突变可抑制细胞分化、阻止特异神经元的发生; Unc-86 表达异常可导致细胞死亡或特异功能丧失^[16]. 但在细胞分化后再使 Unc-86 突变不再影响 Unc-86 的表达, 也不再影响神经元类型的出现. mec-3 是神经细胞表现特异表型有关的重要基因, 其表达依赖 Unc-86, 但 Unc-86 并不是调节 mec-3 表达的唯一因素. Unc-86 和 mec-3 的表达产物按特定调节规律控制一类感觉神经元的分化.

Pit-1 在哺乳类动物垂体前叶发育中的作用具有典型意义. Pit-1 的表达仅限于促甲状腺素分泌细胞、促乳素分泌细胞和生长激素分泌细胞. Pit-1 能独立地对催乳素和生长激素启动子起反式激活作用^[17]. 遗传性侏儒小鼠

16 号染色体若有单一的突变, 则检测不到生长激素、催乳素或甲状腺激素, 也没有分化成熟的三种分泌细胞出现; 若 Pit-1 的两个等位基因均发生突变, 如 Jackson 侏儒, 则导致 Pit-1 基因出现限制性片段长度多态性 (RFLP). Snell 侏儒发生了单个碱基突变 (G→T), 致使基因编码产物 POU_{HD} 内 WFC→CFC, 突变产物再也不能识别 DNA 顺式作用元件^[18]. Pit-1 对垂体前叶上述三种分泌细胞分化具有重要作用, 而三种激素在各自细胞内生理定量表达尚需其它激活和抑制机制.

在哺乳类动物神经系统, Tst-1 (SCIP/Oct-6) 存在于特定神经元及有髓胶质细胞中^[14]. 在胶质细胞髓化开始阶段就有高水平 Tst-1 表达, 说明其参与髓化过程; 可能 Tst-1 是通过与特异 DNA 顺式元件结合, 起转录调节作用. Brn-2 与 Tst-1 同属一组 POU 蛋白, 在大鼠下丘脑副心室背中部表达, 该部位合成并分泌促皮质释放素 (CRH). DNA-蛋白质相互作用分析表明, Brn-2 可选择性地与 CRH 启动子的 5 个位点结合; 其转染实验表明 Brn-2 可使 CRH 启动子转录活性提高 40 倍. 这一事实证明, 哺乳类动物神经系统表达的 POU 蛋白具有转录因子功能, 它们通过选择性地激活不同基因转录, 调节神经元和胶质细胞的分化.

参 考 文 献

- 1 Dessain S, Cross C T, Kuziora M A *et al.* EMBO J, 1992; 11 (3): 991
- 2 Michell P J, Tjian R. Science, 1989; 245: 371
- 3 Treacy M N, Rosenfeld M G. Annu Rev Neurosci, 1992; 15: 139
- 4 Kissinger C R, Liu B, Martin-Blanco E *et al.* Cell, 1990; 63: 579
- 5 Ingraham H A, Flynn S E, Voss J W *et al.* Cell, 1990; 61: 1021
- 6 Verrijzer C P, Kal A J. EMBO J, 1990; 9: 1883
- 7 Treacy M N, Neilson L I, Turne E E *et al.* Cell, 1992; 68: 491
- 8 Stern S A, Tanaka M, Herr W. Nature, 1989; 341: 624
- 9 Kristie T M, Sharp P A. Genes Dev, 1990; 4: 2383

- 10 Treacy M N, He X, Rosenfeld M G. *Nature*, 1991; **350**: 577
- 11 Voss J, Wilson L, Rosenfeld M G. *Genes Dev*, 1991; **5**: 1309
- 12 Gerster T, Roeder R G. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; **85**: 6347
- 13 Scott M P, Carroll S B. *Cell*, 1987; **51**: 689
- 14 He X, Gorrero R, Simmons D M *et al.* *Mol Cell Biol*, 1991; **3**: 1739
- 15 Li S, Greshaw E B, Rawson E J *et al.* *Nature*, 1990; **347**: 528
- 16 Finney M, Ruvkun G. *Cell*, 1990; **63**: 895
- 17 Fox S R, Jong M T C, Casanova J *et al.* *Mol Endocrinol*, 1990; **4**: 1069

横纹肌肌原纤维的第三肌丝——肌联蛋白*

陈 明

(中国科学院上海生理研究所, 上海 200031)

摘要 实验研究证明, 在动物横纹肌肌原纤维中, 除包含有粗肌丝、细肌丝外, 还有纤肌丝的存在。肌联蛋白(肌巨蛋白)是具有挠性的线状蛋白质, 分子量为 3000 000, 长度约为 0.9 μ m。跨越肌原纤维的 M-线和 Z-线, 形成纤肌丝。其生理功能是在粗肌丝装配中具有分子模板作用, 并将粗肌丝稳定于肌原纤维肌小节中央以及可参与肌球蛋白活性的调节。

关键词 肌联蛋白(肌巨蛋白), 纤肌丝, 肌原纤维, 横纹肌

肌肉收缩是动物运动并赖以生存的重要前提。肌肉细胞是怎样构筑的? 肌肉收缩是如何发生的? 早在 50 年代, Huxley 和 Niedergerke 以及 Huxley 和 Hanson 提出了著名的滑行肌丝模型(sliding filament model)。迄今为止, 普遍认为肌肉肌原纤维是由粗肌丝(肌球蛋白丝)和细肌丝(肌动蛋白丝)有规律地排列所形成, 肌肉的收缩与舒张是两组肌丝依赖 ATP 水解所释放的自由能而发生相对滑动的结果^[1-3]。

1 横纹肌肌原纤维中存在第三肌丝——纤肌丝

用高浓度的碘化钾(0.6mol/L)溶液处理肌原纤维, 可以溶去肌球蛋白丝的肌动蛋白丝, 然而肌原纤维仍可维持着整齐的构架, 且具有一定的张力。这种失去肌动蛋白和肌球蛋白而不解体的肌原纤维, 称为“幻影肌原纤维”(ghost myofibril; Huxley 和 Hanson 1954 年)。日本学者 Natori (1954 年) 也发现机械去

膜的肌肉细胞继续保留着“弹性”, 并且指出这种“弹性”与连接于肌膜的胶原纤维成分无关, 而是源自存在于肌肉细胞内的“内弹性结构”。这表明在肌肉细胞内, 除含粗肌丝和细肌丝外, 尚存在与肌肉细胞纵向相平行的结构以维持肌原纤维的形态和肌肉细胞的张力。事实上, 在以后的电子显微镜学的研究中, 终于在经过拉长的肌肉细胞内, 可以观察到一种新的超细肌丝, 它将粗肌丝与 Z-线联接起来。对此, 不同学者给以不同的名称, 如 C-肌丝、S-肌丝、T-肌丝、端肌丝、缝隙肌丝、弹性肌丝、第三肌丝或纤肌丝(fine filament)^[4,5]。最近, Funatsu 等^[6]利用胶溶蛋白(gelsolin)和高浓度醋酸钾分别选择性地溶解肌肉细胞中的肌动蛋白丝和肌球蛋白丝, 藉冰冻蚀刻复型技术, 在电子显微镜下更清楚地显示了纤肌丝的存在。纤肌丝与肌肉细胞纵向相平行, 跨越肌原纤维的 M-线与 Z-线, 直径仅约为 4nm。

*国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1993-06-13, 修回日期: 1993-11-12

Recent Advances in the Study of Haptoglobin.

Wang Fengjun, Huang Wenhua, Li Ao. (*Burn Institute, The Third Military Medical College, Chongqing 630038*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (5): 386--389

Haptoglobin, belonging to the group of acute phase reactant proteins in the serum, is an acidoglycoprotein, and exhibits genetic polymorphism by the difference in the types of light chains it contains. The biosynthesis and degradation of haptoglobin are mainly carried out in the liver and regulated by some cytokines, prostaglandins and hormones. Haptoglobin has multifaceted biological activities, so it is believed that haptoglobin may be an important regulating protein to be present in the serum.

Key words haptoglobin, structure, function

Recent Advance on Spider Peptide Neurotoxin

Research. Liang Songping, Pan Xin. (*Department of Biology, Hunan Normal University, Changsha 410006*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (5): 390—395

The chemical structures and physiological functions of spider peptide neurotoxins have been reviewed and introduced. These neurotoxins can be classified briefly into two groups according to their size. The short spider neurotoxins contain 33 to 40 amino acids residues, whereas the long ones have 66 to 77 residues. The homologies of the neurotoxins from different species are not evident and the physiological activities are quite different. Some spider neurotoxins were found to selectively affect the sodium or calcium channels of the neuromuscular system of the insect and vertebrate and were believed to be useful as tools in neurophysiology and pharmacology studies.

Key words spider toxin, neurotoxin, pep-

tide, ion channel

Glutathione: Detoxication and Toxic Metabo-

lites. Cheng Yuankai. (*Institute of Labor Hygiene, Anshan Iron and Steel Complex, Anshan 114001*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (5): 395—399

Glutathione is the major nonprotein sulfhydryl present in cells and plays an important role in the deactivation of oxygen radicals, organic hydroperoxides and electrophiles. However, recent studies show that conjugation of glutathione with some vicinal dihaloalkanes, haloalkenes, quinoid compounds, isocyanates, isothiocyanates, aldehydes, α , β -unsaturated aldehydes etc. will lead to the formation of toxic metabolites.

Key words glutathione, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, detoxication, toxic metabolites

The Function of POU-domain Proteins in Development of Central Nervous System.

Zhang Li, Jia Hongti. (*Department of Biochemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (5): 400—403

A family of POU-domain proteins is a class of DNA specific transcription factors that contain homeodomains (HD). During development of the central nervous system (CNS), the spatial and temporal expression for the POU-domain proteins may play a crucial role in the appearance of neuronal phenotypes via both homodimeric and heterodimeric protein-protein interactions and DNA-protein interactions in gene regulation.

Key words POU-domain protein, transcription factors, development of central nervous

system

The Fine Myofilament of Myofibril of Striated

Musale: Connectin. Chen Ming. (Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (5): 403—406

In the myofibril of striated muscle, there are three myofilaments: thick, thin, and fine myofilaments. Titin (connectin) is a giant elastic contractile protein, with molecular weight of 3000 kD and length of 0.9 μm , and forms fine myofilament extended from M-line to Z-line in the myofibril. It may play roles in maintaining thick myofilament in the middle of sarcomere, acting as molecular template for assembly of thick myofilament, and modulating the myosin activity.

Key words connectin (titin), fine myofilament, myofibril, striated muscle

Production of the Useful Protein in the Silkworm Using the *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus as a Expression Vector. Zhang Yuqing. (Suzhou Sericulture College, Suzhou 215151). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (5): 406—410

More and more foreign genes have been expressed in the silkworm larvae or silkworm cell lines using the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) as a expression vector. The expressed products involve in many fields such as pharmaceuticals, medical diagnosis, vaccine production and biological control. The characteristics of BmNPV and its genome structure, characteristics of polyhedrin gene, construction of recombinant BmNPV and its expression in the silkworm larvae and cell line, and efficiency of production for the foreign gene products expressed in the silkworm-Bm-

NPV system and application of the expressed product were described systematically in the review.

Key words silkworm, *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, polyhedrin gene, gene expression, recombinant virus, expression vector

Structure and Phamacology of V-ATPase. Cai Huiluo. (Institute of zoology, Academia Sinica, Beijing 100080). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (5): 410—414

V-ATPases are present in large numbers of organelles including lysosomes, endosomes, golgi complex and several secretory granules in animal cell. The function of V-ATPase is to generate protonmotive force and to cause limited acidification of the internal space of vacuolar system and extracellular compartments at the expense of ATP. The acidification and the electrochemical H^+ gradient formed by V-ATPase serve an improtant function in endocytosis, exocytosis, membrane traffic and transport systems of cells. In the families of H^+ -ATPases, increasing attention is being given to V-ATPase, about which much has been learned in recent years.

Key words V-ATPase, electrochemical proton gradient $\Delta\mu\text{H}^+$, vacuolar system

Progress of Interferon-Stimulated Genes (ISGs) Research. Li Zhou, Fan Qixiu. (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300020). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (5): 414—417

Interferon-stimulated genes (ISGs) is the central part of the research on interferon (IFN) function mechanism. After IFN binds to its receptor, through signal transducing in cyto-