

## 微型述评

## Raf-1 蛋白激酶在细胞信号转导研究中的新进展\*

李彪 李晓玫

(北京医科大学第一医院, 北京 100034)

**摘要** 重点讨论 Raf-1 蛋白激酶的特征、激活方式及其与其他蛋白质相互作用等方面的研究进展。Raf-1 蛋白激酶是酪氨酸激酶相关信号转导途径中的重要信号分子之一, 可直接下传与 Ras 蛋白相关的细胞增殖信号。近年来发现, Raf-1 蛋白激酶还可与其他信号分子作用或相互调节, 参与多种细胞生物学过程的信号转导与调控。

**关键词** 信号转导, 蛋白激酶, Raf-1, 细胞

**学科分类号** Q555, Q73

## 1 Raf-1 蛋白激酶及其分子生物学特征

v-raf 于 80 年代分离自猪肉瘤病毒, 不久在正常细胞中发现了相应的原癌基因 c-raf-1, 并发现其编码蛋白可广泛地表达于各类组织细胞中。随后又相继发现了 A-raf 和 B-raf, 并证实它们的编码蛋白只在特定组织(泌尿生殖或神经系统)中表达。目前研究最为深入的是 c-raf-1 的表达产物, 即 Raf-1 蛋白激酶。

Raf-1 蛋白激酶由 648 个氨基酸组成<sup>[1]</sup>, 分子质量为 70~74 ku, 活化后具有丝/苏氨酸蛋白激酶活性。其分子结构中含有 3 个保守区, CR1 位于其分子的氨基端, 与蛋白激酶 C 的配体结合区结构相似, 是活化的 Ras 与 Raf-1 结合的部位。CR2 亦靠近氨基端, 富含丝、苏氨酸。CR3 位于羧基端, 是蛋白激酶的催化功能区。

## 2 Raf-1 蛋白激酶的激活方式及其特征

酪氨酸蛋白激酶的活化对 Raf-1 激活具有重要作用。在 Ras/Raf-1 增殖信号途径中, Raf-1 位于 Ras 下游, 其激活的初始事件是生长因子激活特异的受体酪氨酸激酶, 活化的受

体首先作用于 Grb2-Sos 蛋白复合物, Sos 可使 Ras 活化, 后者进一步激活 Raf-1。Raf-1 被激活后即继续激活其下游的 MEK 和 MAPK, 最终通过对转录调节因子表达的影响而将细胞增殖信号传递到细胞核内。Raf-1 能否被激活、是否能够准确地下传信号对于细胞是否出现增殖效应至关重要。近年来发现, 非受体酪氨酸激酶如 Src、Fyn、Lck 等也可通过其 SH2 结构域与 Raf-1 结合, 并可磷酸化其 340、341 位的酪氨酸, 使之改变构象而被激活。如在 Jurkat 细胞中, HIV 病毒颗粒或重组 HIV 糖蛋白 GP120 作用于细胞表面分子 CD4 后, 发现酪氨酸蛋白激酶 Lck 与 Raf-1 结合在一起, 其间并无 Ras-GTP 产生及 Ras/Raf-1 复合物形成, 提示 Raf-1 活化与 Ras 无关, 而 Lck 介导起了决定性作用。

对 Raf-1 的激活方式已有了较为清楚的认识。Ras 与 Raf-1 常以复合物形式存在。其主要结合位点可能为 Raf-1 之 Arg89, 结合的区域主要位于 Raf-1 的 RBD 与 Ras 的效应功能区以及 Raf-1 的 CRR 与 Ras 的激活区之间,

\* 国家自然科学基金资助项目 (39570340)。

收稿日期: 1998-02-06, 修回日期: 1998-04-21

这两个区域的结合对稳定 Ras/ Raf-1 复合体十分重要。研究发现, 尽管 Raf-1 与 Ras 常结合在一起, 但 Ras 并非直接激活 Raf-1。在体外实验中, Ras/ Raf-1 复合物并不能使 Raf-1 激活, 将其与被 Src 或 Ras 转化的细胞提取物共同孵育也不能活化 Raf-1。Stokoe 等<sup>[2]</sup>将起膜定位作用但并无 Ras 活性的 k-Ras 羧基端 17 个氨基酸的基因序列与 Raf-1 之羧基端融合表达出融合蛋白, 发现其酶活性与和肿瘤源性 Ras 共表达的 Raf-1 活性相似, 而非膜定位的另一融合蛋白并无 Raf-1 活性, 因而提出 Ras 可能仅具有使 Raf-1 由胞浆定位于胞膜的作用。有人用 raf-1 基因与 v-ras 基因或 src 基因共转染 NIH3T3 细胞, 发现当 src 与 raf-1 共表达时, Raf-1 活性升高 5 倍, 但当 raf-1 与 src 和 ras 共表达时, 其活性升高 25 倍, 磷酸化酪氨酸也升高 3 倍<sup>[3]</sup>。目前证实, 在 Ras/ Raf-1 信号途径中, Ras 主要是催化胞浆中的 Raf-1 使之固定于细胞膜内侧, Raf-1 一旦与胞膜的脂质层相互作用即可暴露出其激酶功能区, 进一步可能由其他非 Ras 依赖的信号分子 (如蛋白激酶 C、酪氨酸激酶、其他丝/ 苏氨酸激酶、磷酸酶或配体等) 而激活。

对 Raf-1 进行分析, 已发现其分子中 43、259 及 621 位是主要的丝氨酸磷酸化位点, 而 340、341 是主要的酪氨酸磷酸化位点。不同位点的磷酸化对 Raf-1 活性具有不同的意义。无论是静止型还是被刺激的细胞, 第 43 位、第 621 位丝氨酸都可被磷酸化。若将第 43 位丝氨酸替代为甘氨酸, 对 Raf-1 活性并无影响, 故它可能的作用是影响 Ras 与 Raf-1 的结合。而若将第 621 位丝氨酸替代为其他氨基酸, 则直接影响 Raf-1 活性, 表明其磷酸化对 Raf-1 的催化功能区构象改变有很大影响。第 259 位丝氨酸的磷酸化对 Raf-1 活性起抑制作用, 将其替代为甘氨酸后, 可使 Raf-1 活性上升 2 倍多<sup>[4]</sup>。最近发现其磷酸化还可能关系到 Raf-1 与 14-3-3 蛋白的结合。Raf-1 的酪氨酸磷酸化位点对于 Raf-1 蛋白的构象改变十分重要, 可使其催化功能区得到活化。

目前还发现了一些与 Raf-1 结合及激活调节相关的细胞内蛋白, 如 14-3-3、HSP90、HSP50、Bag-1 等。14-3-3 蛋白广泛表达于许多组织器官, 是进化上相当保守的酸性蛋白。研究表明, 14-3-3 蛋白总是与 Raf-1 结合在一起, 而不论其活化状态、所处的细胞内位置以及是否与 Ras 结合<sup>[5]</sup>。其结合位点为 Raf-1 的 Cys-165、Cys-168 及 Ser-259, 其中 Ser-259 的磷酸化与否直接影响二者的结合。但 14-3-3 蛋白结合与否对 Raf-1 酶活性并无影响。其他一些蛋白如 HSP90、HSP50 也能与 Raf-1 结合, 可能对维持 Raf-1 的稳定性及其细胞内定位十分重要, 但它们均不能直接活化 Raf-1。最近有人报道凋亡抑制基因 bcl-2 的结合蛋白 Bag-1 能结合于 Raf-1 之催化活性区并使之活化。还有人在 MDCK 细胞中发现, 磷脂酸能结合于 Raf-1 羧基端, 对 Raf-1 定位于细胞膜以及随后之活化有重要作用。尽管这些蛋白的生理意义尚有待进一步阐明, 但由此可见 Raf-1 激活的机理不但具有细胞与刺激物特异性, 而且可能是多层次、多种因素相互作用的结果。

Raf-1 蛋白激酶是一个功能十分活跃的信号酶分子, 已有研究证实它不但在细胞增殖信号途径中扮演着重要角色, 在其他多种细胞信号转导途径的相互作用中亦起着交联点的作用, 并与细胞分化、细胞凋亡以及细胞的应激反应等多种细胞生物学效应调节相关。对于 Raf-1 蛋白激酶的深入研究将有助于揭示细胞生命活动的精细调节机制, 同时也将有助于深入了解多种病理生理过程中细胞异常增殖及分化的发生机制。

## 参 考 文 献

- 1 Morrison D K. The Raf-1 kinase as a transducer of mitogenic signal. *Cancer Cells*, 1990, 2 (12): 377~ 382
- 2 Drugan J K, Khosravi-Far R, White M A *et al.* Ras interaction with two distinct binding domain in Raf-1 may be required for Ras transformation. *J Biol Chem*, 1996, 271 (1): 233~ 237
- 3 Marais R, Light Y, Paterson H F *et al.* Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J*, 1995, 14 (13): 3136~ 3145
- 4 Morrison D K, Heidecker G, Rapp U *et al.* Identification

of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. J Biol Chem, 1993, **268** (23): 17309~ 17316

5 Fu Ha, Xia K, Pallas D C *et al.* Interaction of the protein kinase Raf-1 with 14-3-3 proteins. Science, 1994, **266** (5182): 126~ 129

**Research Progress of Raf-1 Protein Kinase in Signal Transduction.** LI Biao, LI Xiao-mei ( *The First Hospital and Institute of Nephrology, Beijing Medical University, Beijing 100034, China* ).

**Abstract** Raf-1 protein kinase has been known as an important component of Ras/ Raf-1/ MAPK signaling pathway related to cell proliferation. It also may be a cross-talk point among different signal transduction pathways. This is a review about the characteristics of Raf-1 molecule, its activation and relationship with other proteins.

**Key words** signal transduction, protein kinase, Raf-1, cells

# 外源基因在叶绿体中表达的研究

范国昌<sup>1)</sup> 张中林 钱凯先<sup>1)</sup> 沈桂芳  
( 中国农业科学院生物技术研究中心, 北京 100081)

**摘要** 综述了叶绿体表达系统的特点, 及国内外此方面的研究动态, 提出了外源基因在叶绿体中表达存在的问题和解决策略.

**关键词** 叶绿体, 外源基因表达体系, 同质化

**学科分类号** Q78

自 1962 年, Ris 和 Plaut 利用电镜首次证明叶绿体中含有 DNA 以来, 学者们一直致力于研究它的结构和功能. 随着研究的深入, 人们对叶绿体提出了新的课题: 外源基因能否在叶绿体中表达? 表达量如何? 本文综述近年来国内外此方面的研究成果并就此进行探讨.

## 1 叶绿体表达系统的特点

叶绿体基因组的遗传表达体系具有原核性. 其基因组分子质量小, 无组蛋白、易操作, 基因的排列方式, 调控方式, GC 碱基对含量以及翻译所偏爱的密码子与原核生物相接近, 这将有利于来自原核生物的基因 (如 Bt 毒蛋白基因等) 的直接高效表达. 同时叶绿体基因组具有某些真核基因组的特点, 所以叶绿体也有可能直接表达来自真核生物的基因.

大多数植物的叶绿体基因组为多顺反子转

录单位, 根据对 15 个质体基因连缀转录物测量的结果, 发现在质体中, 一些基因的转录活性大约有 300 倍的差别, 其 RNA 水平有 900 倍的变化. 而且质体中不同 mRNA 的稳定性差别很大, 许多叶绿体 mRNA 的稳定性和位于 3' 端非翻译区的一些短倒位重复序列有关, 而 mRNA5' 端多样性的加工可能控制一些 mRNA 在不同物种、不同发育阶段的翻译能力. 在叶绿体中, 有关蛋白质的翻译后修饰, 研究最广泛的是其磷酸化, 无论是内外包被膜、类囊体膜、基质中都发现有磷酸化的蛋白质<sup>[1]</sup>.

叶绿体遗传方式是母系遗传, 所以一旦得到叶绿体稳定转化植株, 其自交后代应当全部是转化纯系. 这一特点还决定了性状不会通过花粉进行传递, 更有利于环境保护.

<sup>1)</sup> 浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027.  
收稿日期: 1997-10-31, 修回日期: 1998-04-03