

核糖体蛋白 L6/ Taxreb107 的核定位信号的分析*

王冀姝¹⁾ 杨 曦¹⁾ 李 荣¹⁾ 周 鹏¹⁾ 张森丽²⁾ 韩 骅^{1)**}

(¹⁾第四军医大学医学遗传学与发育生物学教研室, 西安 710032; ²⁾第四军医大学解剖教研室, 西安 710032)

摘要 核糖体蛋白 L6 (RpL6, Taxreb107) 含有三个具有核定位信号特征的基序。用作者构建的核定位信号捕获系统分析了这些核定位信号是否具有介导蛋白质进行核转位的功能。将 RpL6/Taxreb107 分段插入核定位信号捕获载体的克隆位点后转化宿主酵母, 发现其前两个核定位信号可以介导融合蛋白进入细胞核, 而第三个核定位信号无此作用。将 RpL6/Taxreb107 分段与绿色荧光蛋白融合后转染培养的哺乳类细胞, 证实了以上在酵母中所得的结果。进一步发现 RpL6/Taxreb107 的前两个核定位信号同时具有核仁定位的功能。当在细胞中表达的早期, 进入核内的融合蛋白优先定位于核仁。这些结果一方面有助于理解 RpL6/Taxreb107 核转位的机理, 同时说明作者构建的核定位信号捕获系统也可用在蛋白质中寻找核定位信号。

关键词 核定位信号, 核糖体蛋白 L6, 核转位, 绿色荧光蛋白

学科分类号 Q243, Q51

真核细胞在长期进化中形成了各种细胞器, 以使细胞内生化反应得以在最适的微环境中进行。因此, 参与各种反应的蛋白质在合成后必须定位于相应的细胞位置以完成其生理功能。这种蛋白质在细胞内的分配 (protein sorting) 可由多种机制介导, 但其基本的特性之一是被分配的蛋白质上常带有特定的分配信号。比如被分泌到细胞外的蛋白质 N 端上一般都具有一段疏水性氨基酸组成的肽段, 即信号肽^[1]; 而进入细胞核的蛋白质常常带有介导核定位的基序——核定位信号 (nuclear localization signal, NLS)^[2]。

分配到特定部位的蛋白质具有特定的定位信号, 这一特征被用来克隆分配到特定部位的蛋白质。这种克隆思路被称为基序捕获 (motif trap)^[3]。其中比较成熟也是比较引人注目的是由 Tashiro 等^[4]首先建立的信号肽捕获系统 (signal sequence trap, SST)。这一系统几经改进, 现已成为克隆分泌性蛋白的有力工具之一。Ueki 等^[5]和王冀姝等^[6]分别建立了用于克隆核定位蛋白的遗传筛选系统, 即 NLS 捕获系统。其基本原理是构建一酵母穿梭载体, 可表达不含 NLS 的人工转录因子, 并含有一个出核信号 (nuclear export signal, NES) 以保证在没有 NLS 存在时人工转录因子定位于胞浆而不能进入细胞核, 激活受人工转录因子调控的报告基因的转录。将 cDNA 文库插入人工转录因子下游的多克隆位点后转化酵母宿主。如果与人工转录因子融合表达的 cDNA 编码一 NLS, 人

工转录因子就可进入细胞核而激活报告基因的转录, 表现为酵母可在选择性培养基上生长, 反之则不能。

我们利用这一克隆系统筛选了 10.5 dpc 小鼠胚胎的 cDNA 文库^[7]。除了其他含有 NLS 的基因片段外, 我们筛选到了小鼠核糖体蛋白 L6 (ribosomal protein L6, RpL6)。RpL6 作为核糖体的成分之一, 在胞浆中被合成后即转位到细胞核内。在核内 RpL6 定位于核仁, 与其他核糖体组分一道装配成为核糖体, 再输送到胞浆发挥作用。除此之外, RpL6 还可能在人 T 细胞白血病病毒 I (human T-cell leukemia virus I, HTLV-I) 的生活周期中发挥作用^[8]。因而 RpL6 又被称为 Taxreb107 (Tax response element binding protein 107)。实验证明, RpL6/Taxreb107 可结合于病毒启动子, 即其长末端重复序列 (long terminal repeat, LTR), 这种结合可能有助于病毒启动子通过细胞蛋白 CREB (cAMP response element binding protein) 募集病毒编码的转录激活物 Tax, 从而开始病毒的复制^[9]。这些功能都有赖于 RpL6/Taxreb107 定位于细胞核。

* 国家自然科学基金资助课题 (39970376)。

** 通讯联系人。

Tel: 029-3374488, E-mail: huahan@fmmu.edu.cn

收稿日期: 2001-06-16, 接受日期: 2001-07-23

用蛋白质细胞内定位软件 PSORT 分析 RpL6/Taxreb107 的氨基酸序列发现 RpL6/Taxreb107 可能含有至少三个 NLS. 但这些 NLS 中的哪些可真正发挥核定位功能并不清楚, 也不清楚他们是否也和 RpL6/Taxreb107 的核仁定位有关. 本研究利用我们建立的 NLS 捕获系统分析了 RpL6/Taxreb107 蛋白中不同 NLS 的功能, 并进而用培养的哺乳动物细胞加以验证.

1 材料与方法

1.1 材料

NLS 捕获系统载体 pGL-NLS⁺ 已被报道^[7]. 全长 RpL6/Taxreb107cDNA 系用 NLS 捕获系统从小鼠胚胎 cDNA 文库筛选得到, 并经 DNA 序列分析证实^[7]. 增强绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescence protein, EGFP) 融合表达质粒 pEGFP 来自 Clontech 公司. 酵母宿主菌 EGY48 [Genotype: *ura3*, *his3*, *trp1-901*, *trp1*, *LexAop* ($\times 6$) - *LEU2*]、大肠杆菌 DH5 α 、细胞系 COS7 由本室保存. 实验所用的培养液、酶等其他试剂分别购自 GIBCO/BRL、宝生物工程公司及 Promega 公司.

1.2 方法

1.2.1 重组 DNA: DNA 重组方法按文献 [10] 进行. 为了构建的 RpL6/Taxreb107 不同片段与 EGFP 的融合表达载体, 分别用 *EcoRI* 和 *SmaI*, *EcoRI* 和 *StuI*, *EcoRI* 和 *ScaI*, *HindIII* 和 *BamHI*, *HindIII* 和 *StuI*, 5 组酶对全长的 cDNA 进行分段酶切. 按照读码框分别克隆到 pEGFP-C 中.

1.2.2 酵母的转化及质粒提取: 质粒的酵母转化按文献 [6] 用 LiAc 法进行. 用质粒 DNA 转化酵母宿主后使之生长于 SD/-Trp (色氨酸缺陷) 培养基上进行扩增, 然后接种于 SD/-Leu, Trp (亮氨酸, 色氨酸缺陷) 的培养基上观察其生长状态.

1.2.3 细胞培养和转染: COS7 细胞培养于 DMEM 培养液 (添加有 10% 胎牛血清, 2 mmol/L L-谷氨酰胺、青霉素及链霉素) 中. 用 Pharmacia 公司的磷酸钙共沉淀法转染试剂盒 (Cellfect Transfection Kit) 进行细胞转染. 转染前, 将 1×10^5 细胞接种于 6 孔培养板中过夜培养, 使细胞生长到汇合率为 40% ~ 60%. 取 1 μ g 待转染 DNA 与试剂盒提供的 CaCl_2 溶液 (缓冲液 A) 混合, 室温孵育 10 min 后, 加入试剂盒提供的磷酸缓冲液 (缓冲液 B), 立即混合后放于室温 15 min 使沉淀形成. 将形成的 DNA-磷酸钙沉淀加入细胞培养

液, 培养 12 h 后用培养液洗细胞, 用 15% 等渗甘油溶液处理细胞 3 min, 再更换成普通培养液. 继续培养 48 h 后, 用 4% 多聚甲醛固定, 荧光显微镜下观察并照相.

2 结 果

2.1 RpL6/Taxreb107 的细胞内定位分析

在用核定位信号捕获系统从 10.5 d 小鼠胚胎 cDNA 文库筛选核定位蛋白基因时, 我们得到了 RpL6/Taxreb107cDNA 片段^[7]. 为了分析 RpL6/Taxreb107 在细胞内的定位, 首先我们把全长 RpL6/Taxreb107 cDNA 按读框与 EGFP 融合后, 在培养的细胞中进行表达. 然后在荧光显微镜下观察表达的 RpL6/Taxreb107 蛋白在细胞内的分布. 结果与其他核糖体蛋白一样, 细胞内表达的 RpL6/Taxreb107-EGFP 融合蛋白分布于细胞核内 (未显示结果).

用蛋白质细胞内定位分析软件 PSORT 分析 RpL6/Taxreb107 的氨基酸序列, 见 RpL6/Taxreb107 含有三个可能的 NLS, 它们分别位于氨基酸残基 31~41 (NLS1), 68~84 (NLS2) 和 223~226 (NLS3). 为了分析这些 NLS 中哪个具有介导蛋白质核转位的功能, 我们用限制性内切酶将 RpL6/Taxreb107 进行了分段. 如图 1b (从上到下) 所示: 片段 1 为全长 RpL6/Taxreb107; 片段 2 同时含有 NLS1 和 NLS2; 片段 3 和片段 4 分别含有 NLS1 和 NLS2; 片段 5 含有 NLS3; 片段 6 不含 NLS, 为阴性对照. 将这些片段按读框分别插入图 1a 的 NLS 捕获载体的克隆位点, 转化宿主酵

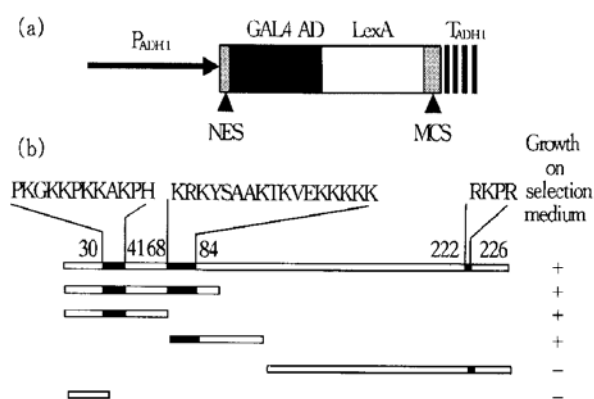


Fig. 1 Analysis of NLS in RpL6/Taxreb107 using the NLS trapping system

(a) representative of the NLS-trapping vector; (b) full length or different fragments of RpL6/Taxreb107 was inserted to the multiple cloning sites (MCS) of the NLS-trapping vector and used to transform host yeast. The growth of yeasts on selection plates was indicated on the right.

母后观察其生长. 结果见转化含全长 RpL6/Taxreb107 的质粒使酵母可以在选择性平板上生长, 而转化不含 NLS 片段的质粒不能使酵母在选择性平板上生长, 说明系统可以正常工作. 转化含有 NLS1 及/或 NLS2 的质粒可以使酵母在选择性培养基上生长而 NLS3 无此功能, 表明 NLS1 和 NLS2 具有核定位功能而 NLS3 没有.

2.3 NLS1 和 NLS2 在哺乳动物细胞中的核定位功能

为了进一步确认上述结果, 我们将全长或不同的 RpL6/Taxreb107 基因片段按读框插入质粒 pEGFP, 以在哺乳类细胞中表达与 EGFP 融合的

全长 RpL6/Taxreb107 或其片段, 并在荧光显微镜下观察其细胞内定位. 结果如图 2 所示. 全长 RpL6/Taxreb107 (图 2a)、带有 NLS1 和 NLS2 的片段 (图 2b) 以及分别带有 NLS1 (图 2c) 和 NLS2 (图 2d) 的片段都可以使融合蛋白定位于细胞核中, 而带有 NLS3 (图 2e) 或不带有 NLS 的片段 (图 2f) 的融合蛋白定位于细胞浆中. 说明 NLS1 和 NLS2 都具有促使蛋白质核转位的功能而 NLS3 没有. 进一步观察图 2 结果, 见 NLS1 和 NLS2 尚可促使融合蛋白定位于核仁.

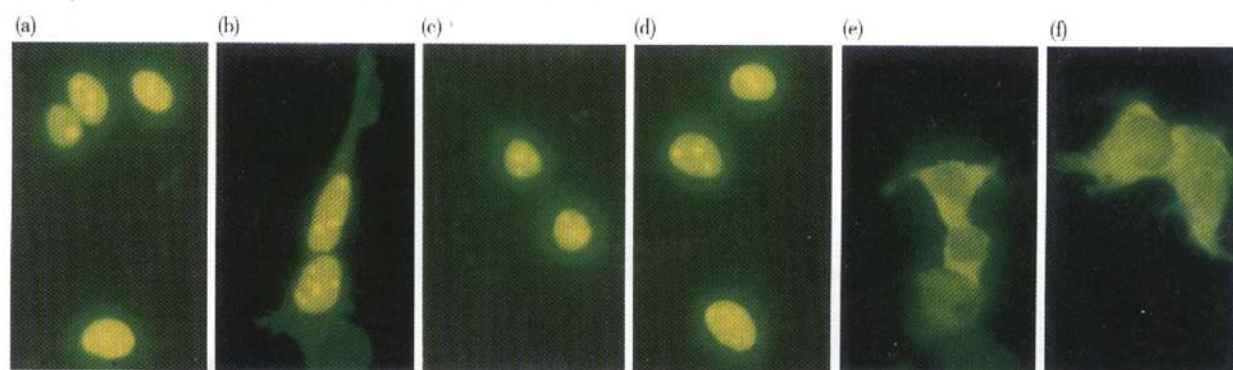


Fig. 2 Analysis of NLS in RpL6/Taxreb107 with EGFP fusion protein system

Full length or different fragments of RpL6/Taxreb107, as indicated in Fig. 1b, was inserted in frame to the cloning sites of the pEGFP. COS7 cells were transfected with the plasmids and the intra-cellular localization of the fusion protein was observed under microscope.

2.4 RpL6/Taxreb107 优先定位于核仁

正常情况下, 核糖体蛋白被合成后立即进入细胞核, 并定位于核仁而被装配成为核糖体. 然而, 以上荧光显微镜实验结果显示在细胞内表达的 RpL6/Taxreb107 或其有核定位功能的片段虽然也存在于核仁, 但也大量存在于核基质中. 这种现象可能是由于细胞内表达量过高造成的. 为了排除这种情况, 我们观察了表达后不同时间点时 RpL6/Taxreb107-EGFP 融合蛋白的细胞内定位. 图 3 表明转染后 16 h 即有 RpL6/Taxreb107-EGFP 融合蛋

白表达, 这时表达的融合蛋白几乎完全定位于核仁. 随着转染后时间的延长 (转染后 32 h 和 64 h), 表达的融合蛋白则出现于核基质中. 这一结果说明 RpL6/Taxreb107 是优先定位于核仁的, 但在细胞内表达量过高时, 也可出现在核基质中.

3 讨 论

研究蛋白质的细胞内定位是了解蛋白质功能的基本指标之一. 核内蛋白质如转录因子在许多基本细胞生物学行为诸如增殖、分化、凋亡等的调控上发挥重要作用, 所以克隆核内蛋白质的基因、分析其核定位的分子机理, 具有十分重要的意义. 胞浆中合成的蛋白质通常可以以两种方式进入细胞核. 小分子蛋白质 (通常分子质量小于 60 ku) 可以自由通过核孔复合物而在胞浆与胞核间穿梭; 大分子蛋白质, 如许多转录因子及其他在细胞增殖、分化等方面发挥重要作用的核内蛋白质, 则不能自由进入细胞核. 其核转位常由蛋白质上的核定位信号所介导^[2]. 为了选择性地从基因文库中筛选核定位蛋白的基因, 我们和其他实验室分别建立了根据基

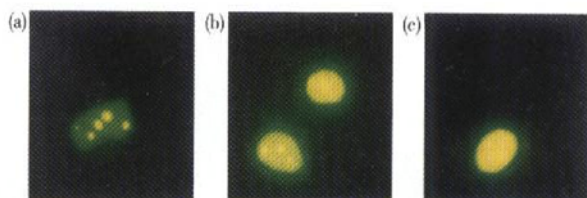


Fig. 3 Time course of the intra-cellular distribution of RpL6/Taxreb107-EGFP fusion protein after transfection

Full length RpL6/Taxreb107 cDNA was inserted in frame to pEGFP and expressed in COS7 cells. Cells were fixed in indicated time point (16 h, 32 h and 64 h) after transfection and observed under fluorescence microscope. (a) 16 h; (b) 32 h; (c) 64 h.

因编码蛋白的核定位功能特征来进行克隆的遗传筛选系统^[5~7]。这一系统不仅可以从 cDNA 文库中筛选出含有 NLS 的基因片段,还可以从已知能够进入细胞核但不含有已知 NLS 序列的蛋白质中鉴定新的 NLS。本研究用这一系统分析了 RpL6/Taxreb107 的核定位信号,并在哺乳类细胞中进行了证实。这一系统为蛋白质分子功能研究提供了一种新的途径。

真核细胞的核糖体含有大约 80 种核糖体蛋白。由于核糖体的装配是在核仁中进行,所以核糖体蛋白的胞浆-细胞核转运一直是研究蛋白质核定位的模型系统。一般认为,新合成的核糖体蛋白会迅速被主动转运到细胞核内,残存于胞浆的则被迅速降解。所以,核糖体蛋白的细胞内定位均显示定位于胞核。这一点与本研究的结果一致。

以往的研究提示核糖体蛋白基因是由一个共同的祖先基因进化而来的。然而,各种核糖体蛋白的核定位机制似乎不尽相同^[11~14]。例如,人 RpS6 的三个 NLS 的任何一个都足以介导其核定位^[13];而人 RpL7a 的核定位则需要不同结构域之间的协同作用^[14]。另一方面,多种细胞内转运蛋白也被涉及不同核糖体蛋白的核定位^[15,16],包括 importin β , transportin, RanBP5 以及 RanBP7 途径。本研究的结果表明 RpL6/Taxreb107 的三个 NLS 的前两个分别具有介导蛋白质核定位的功能,同时发现它们还具有核仁定位的活性。这些 NLS 通过哪种细胞内转运机制介导 RpL6/Taxreb107 的核定位尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Blobel G. Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77** (3): 1496~ 1500
- 2 Dingwall C, Laskey R A. Nuclear targeting sequences: a consensus? *TIBS*, 1991, **16** (12): 478~ 481
- 3 Bejarano L A, Gonzalez C. Motif trap: a rapid method to clone motifs that can target proteins to defined subcellular localisations. *J Cell Science*, 1999, **112** (pt23): 4207~ 4211
- 4 Tashiro K, Tada H, Heilker R, *et al.* Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane protein. *Science*, 1993, **261** (5121): 600~ 603
- 5 Ueki N, Oda T, Kondo M, *et al.* Selection system for genes encoding nuclear-targeted proteins. *Nat Biotechnol*, 1998, **16** (13): 1338~ 1342
- 6 王冀姝, 陈 萍, 孙 强, 等. 核定位信号筛选系统的构建. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, **16** (3): 301~ 305
Wang J S, Chen P, Sun Q, *et al.* *Chin J Biochem Mol*, 2000, **16** (3): 301~ 305
- 7 王冀姝, 孙 强, 李 荣, 等. 利用核定位信号筛选系统初步筛选小鼠胚胎核定位蛋白基因. *生物化学与生物物理学报*, 2000, **32** (6): 569~ 573
Wang J S, Sun Q, Li R, *et al.* *Acta Biochim Biophys*, 2000, **32** (6): 569~ 573
- 8 Morita T, Sato T, Nyunoya H, *et al.* Isolation of a cDNA encoding DNA-binding protein (TAXREB107) that binds specifically to domain C of the tax-responsive enhancer element in the long terminal repeat of human T-cell leukemia virus type I. *AIDS Reseach and Human Retroviruses*, 1993, **9** (2): 115~ 121
- 9 Zhao L J, Giam C Z. Interaction of the human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) transcriptional activator Tax with cellular factors that bind specifically to the 21-base pair repeats in the HTLV-I enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (24): 11445~ 11449
- 10 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 11 Timmers A C, Stuger R, Schaap P J, *et al.* Nuclear and nucleolar localization of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal proteins S22 and S25. *FEBS Letters*, 1999, **452** (3): 335~ 340
- 12 Schaap P J, van't Riet J, Woldringh C L, *et al.* Identification and functional analysis of the nuclear localization signals of ribosomal protein L25 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol*, 1991, **221** (1): 225~ 237
- 13 Schmidt C, Lipsius E, Kruppa J. Nuclear and nucleolar targeting of human ribosomal protein S6. *Mol Biol Cell*, 1995, **6** (12): 1875~ 1885
- 14 Russo G, Ricciardelli G, Pietropaolo C. Different domains cooperate to target the human ribosomal L7a protein to the nucleus and to the nucleoli. *J Biol Chem*, 1997, **272** (8): 5229~ 5235
- 15 Jakel S, Gorlich D. Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J*, 1998, **17** (15): 4491~ 4502
- 16 Rout M P, Blobel G, Aitchison J D. A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell*, 1997, **89** (5): 715~ 725
- 17 Rosorius O, Fries B, Stauber R H, *et al.* Human ribosomal protein L5 contains defined nuclear localization and export signals. *J Biol Chem*, 2000, **275** (16): 12061~ 12068

Analysis of Nuclear Localization Signal (NLS) in Ribosomal Protein L6/ Taxreb107*

WANG Ji-Shu¹⁾, YANG Xi¹⁾, LI Rong¹⁾, ZHOU Peng¹⁾, ZHANG Miao-Li²⁾, HAN Hua¹⁾**

¹⁾ Department of Medical Genetics and Developmental Biology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

²⁾ Department of Anatomy, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract Ribosomal protein L6 (RpL6, also called Taxreb107) possesses at least three nuclear localization signal (NLS) -like motifs. The activity of these motifs for their ability to mediate protein nuclear translocation was analyzed by using a NLS trapping system established. The full length or different fragments of RpL6/ Taxreb107 cDNA was inserted to the cloning site of NLS trapping vector and the resulting constructs were used for transformation of host yeast. The result showed that the first two NLS-like motifs of RpL6/ Taxreb107 induced the fusion protein to be transfected into the nucleus while the third one did not. This conclusion was confirmed by transfection of cultured cells with (EGFP) fused with different RpL6/ Taxreb107 fragments. The results also showed that the first two NLS-like motifs of RpL6/ Taxreb107 have nucleolus localization activity. When expressed in cultured cells, the RpL6/ Taxreb107 fragments containing the first two NLS preferentially induced the fusion protein to be transfected into the nucleoli. These results are helpful for understanding of the nuclear translocation of RpL6/ Taxreb107, and also confirmed that the NLS-trapping system is useful for searching NLS in proteins.

Key words nuclear localization signal, ribosomal protein L6, nuclear translocation, green fluorescence protein

* This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China (39970376).

** Corresponding author. Tel: 86-29-3374517, E-mail: huahan@fmmu.edu.cn

Received: June 16, 2001 Accepted: July 23, 2001