

AP-1 辅助激活因子 JAB1 的分子克隆及其与肝细胞生成素的相互作用*

陆承荣 李 勇 董春娜 黎 明 王清明 张成岗 魏玉琳 陈惠鹏 贺福初**

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 利用酵母双杂交方法, 用肝细胞生成素 (HPO) 作为诱饵蛋白在人胎肝 cDNA 文库中筛选到能与 HPO 相互作用的蛋白: AP-1 辅助激活因子 JAB1. 并用 PCR 方法从人胎肝 cDNA 文库中扩出 JAB1 全长 cDNA, 进行 GST-JAB1 原核融合蛋白表达与纯化. 蛋白质结合实验表明, JAB1 与人重组 HPO 以及 COS7 真核表达的 HPO 在体外有结合作用.

关键词 肝细胞生成素, c-Jun 结合蛋白, 转录因子

学科分类号 Q257

近几年本研究室一直在从事肝细胞生成素 (hepatopoietin, HPO) 作用机理的探索. 前期研究结果表明肝细胞表面存在 HPO 特异性受体^[1,2]. HPO 对肝细胞功能进行调控途径之一是通过结合肝细胞表面 HPO 特异受体、并以 EGF 受体为中介激活胞内 MAPK 信号转导通路^[1]. 与 EGF、TGF α 一样, HPO 还是一个自分泌循环因子. HPO 能以一种目前未知的机制分泌到胞外, 又反过来通过 HPO 受体、EGF 受体作用于肝细胞, 刺激肝细胞增殖. 然而有趣的是, 肝细胞在分泌 HPO 的同时, 在肝细胞内又保持较高水平的 HPO. 由此推测, 肝细胞内的 HPO 或许另有重要生理功能, 比如肝切除时免疫调节的肝再生应急反应等. 基于这一设想, 我们开始寻找能在细胞内与 HPO 有特异性相互作用的有关蛋白质; 我们在酵母双杂交系统中利用 HPO 作为诱饵蛋白从人胎肝 cDNA 文库中筛选到 AP-1 辅助激活因子 JAB1 (c-Jun activation domain-binding protein 1).

早期研究证明 JAB1 在细胞内增加转录因子 AP-1 对靶基因激活的特异性^[3]. JAB1 在酵母内的同源物是 pad1, 两者在功能上可以相互取代, 因此, JAB1 与 pad1 定义了一个新的辅助激活因子家族. 本文克隆了 JAB1 全长 cDNA, 利用体外蛋白质结合实验进一步验证 JAB1 与 HPO 的相互作用, 为后续研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

酵母双杂交系统 (yeast two-hybrid system 2)

及人胎肝 cDNA 文库购自 Clontech 公司. pGEX-4T-2 载体、GST 融合表达蛋白纯化系统 (Bulk and Redpack GST Purification Modules, MicroSpin GST Purification Module)、Anti-GST Antibody 及化学发光 (ECL) 显色剂购自 Amersham Pharmacia 公司. pFLAG 载体由吴忆贫博士赠送. 细胞转染试剂购自 GIBCO 公司. Anti-flag antibody 购自 Stratagene. 3-AT, IPTG, Aprotinin 及 PMSF 购自 Sigma 公司. 人重组 HPO (rHPO) 及 HPO 多抗由本室自制.

1.2 方法

1.2.1 酵母双杂交检测 (蛋白质相互作用)^[3]: 编码相应蛋白或多肽的 cDNA 亚克隆到 pAS2-1 (BD) 和 pACT2 (AD) 载体中, 然后共转化酵母 Y190, 在选择培养基 (-Leu, -Trp) 上培养, 长出的菌落转入相互作用培养基 (-Leu, -Trp, -His, 30 mg 3-AT/L), 同时做蓝白斑实验, 检测 LacZ 表达. 详细步骤参见产品说明.

1.2.2 人胎肝 cDNA 文库的筛选: 表达全长 HPO 的 pAS2-1-HPO 作为诱饵筛选以 pACT2 构建的人胎肝 cDNA 文库, 对阳性克隆进行测序.

1.2.3 质粒构建: 把全长 HPO cDNA (375 bp) 以酶切位点 *Eco*RI 和 *Bam*HI 插入 pAS2-1, 形成 pAS2-1-HPO. 把全长 HPO cDNA (375 bp) 以酶

* 国家自然科学基金重点项目 (39830440)、国家重点基础研究项目 (G1998051122) 及国家自然科学基金项目 (30070171) 部分资助.

** 通讯联系人.

Tel: 010-66931246, E-mail: hefc@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2000-07-19, 接受日期: 2000-09-28

切位点 *EcoR* I 和 *Xho* I 插入 pACT2, 形成 pACT2-HPO. pAS2-1-HPO 和 pACT2-HPO 用于酵母双杂交. 把全长 HPO cDNA (375 bp) 以酶切位点 *EcoR* I 和 *Bam*H I 插入 pFLAG 载体, 形成 pFLAG-HPO, 用于真核表达. 用 JAB1 上游引物 5'-gAATTCATggCggCgTCCgggAgCggTATggCG-3' (*EcoR* I) 和下游引物 5'-ggATCCTTAAgAgATgTTAATTTgATTAAACA (*Bam*H I) 从胎肝 cDNA 文库中 PCR 扩增 JAB1 全长 cDNA (1 kb). 再分别把 JAB1 全长 cDNA 克隆到 pAS2-1, 形成 pAS2-1-JAB1, 供酵母双杂交用. 把 JAB1 全长 cDNA 克隆到 pGEX-4T-2, 形成 pGEX-4T-2-JAB1, 用于原核表达.

1.2.4 转染及蛋白质提取: 用 2 μ g pFLAG-HPO 质粒与 5 μ l Lipofectamine 转染 COS7 细胞, 48 h 后用 RIPA 缓冲液 (1 $\times$ PBS, 1% NP-40, Aprotinin 10 mg/L, PMSF 100 mg/L) 裂解细胞, 离心收集细胞总蛋白.

1.2.5 GST-JAB1 融合表达及纯化: 把 pGEX-4T-2-JAB1 转化表达菌株 BL21, 用 0.1 mmol/L IPTG 诱导 7.5 h, 收集菌体, 超声破碎, 收集包涵体. 用 8 mol/L 尿素溶解包涵体 (GST-JAB1 融合蛋白), 再用 PBS 透析复性. 把经复性的 GST-JAB1 融合蛋白上样 Bulk and Redpack GST Purification 纯化柱, 洗去未结合的杂蛋白, 再用还原性的谷胱甘肽从柱上切下 GST-JAB1 融合蛋白. 把切下的 GST-JAB1 融合蛋白用 PBS 透析, 去除还原性的谷胱甘肽. 对照表达的 GST 是可溶性蛋白, 存在于菌体超声上清中, 超声上清直接上柱纯化.

1.2.6 MicroSpin GST Purification 微型纯化柱结合效率检验: 向柱床体积 50 μ l 的 glutathione-Sepharose 4B 中加入 100 μ g GST-JAB1 或 GST, 洗去未结合的蛋白质, 再用还原性的谷胱甘肽切下结合的 GST-JAB1 或 GST, 计算 MicroSpin GST Purification 纯化柱结合效率.

柱结合效率 = (用还原性的谷胱甘肽切下的柱结合蛋白质量 / 上样蛋白质量) $\times$ 100%.

1.2.7 蛋白质结合实验^[3]: 向柱床体积 50 μ l glutathione-Sepharose 4B 的 MicroSpin GST Purification 中加入 100 μ g GST-JAB1 或 GST, 洗去未结合的蛋白, 再向柱中加入 100 μ g rHPO 或 1 mg 转染 pFLAG-HPO 的 COS7 细胞总蛋白, 洗去未结合的杂蛋白, 用还原性的谷胱甘肽从柱上洗下 GST-JAB1/rHPO 或 GST-JAB1/flag-HPO 复合物. 洗下

的复合物同时做 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 和蛋白质免疫印迹.

1.2.8 蛋白质定量: Lowry 法^[4].

1.2.9 蛋白质免疫印迹: 蛋白质样品经过 SDS-PAGE 之后, 电转到 PVDF 膜上, 封闭过夜, 一抗 1:2000, 二抗 1:4000, ECL 显色.

2 结 果

2.1 JAB1 全长 cDNA 的分子克隆及序列分析

用 HPO 作为诱饵蛋白在人胎肝 cDNA 文库中筛选到几株阳性克隆. 测序结果表明其中之一为 c-Jun N 端激活区结合蛋白 JAB1 cDNA 部分序列 (5' 端缺失 117 个碱基). 其他克隆为不同长短的 HPO, 说明 HPO 分子之间有可能在细胞内形成二聚体, 有关结果另文发表. 然后利用 PCR 方法从人胎肝 cDNA 文库中获得 JAB1 全长 cDNA 序列, 测序结果表明与报道完全一致^[5]. 把 JAB1 全长 cDNA 克隆到 pAS2-1, 与 pACT2-HPO 共转化酵母 Y190, 结果再一次表明 JAB1 与 HPO 有相互作用 (结果略). 至此, 我们利用酵母双杂交系统从人胎肝 cDNA 文库中筛选到能与 HPO 有结合作用的蛋白 JAB1, 其 ORF 为 334 个氨基酸. 蛋白质结构域分析软件 (SMART) 分析 JAB1 分子中有一 MPN 结构域 (图 1), 表明 JAB1 属 MOV34 基因家族成员. 目前 MPN 结构域功能不清.

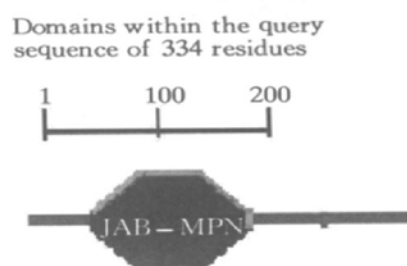


Fig. 1 SMART analysis

An MPN domain (residues 54~191) exists within the 334 residues sequence of JAB1.

2.2 GST-JAB1 融合蛋白的表达与纯化

把经 IPTG 诱导表达的菌体裂解, 用抗 GST 抗体进行蛋白质免疫印迹检测, 结果说明 GST 或 GST-JAB1 的表达 (图 2). 其中 GST-JAB1 样品 (图 2-2) 检测时在分子质量 4 ku 到 6 ku 之间出现几条非特异性条带. SDS-PAGE 表明 IPTG 诱导 BL21 阳性克隆表达的 GST-JAB1, 其分子质量约 65 ku (与蛋白质免疫印迹结果一致), 除去 GST

分子质量 (29 ku) (图 3), JAB1 分子质量约为 35 ku, 与预计值基本一致 (37 ku). 表达的 GST-JAB1 以包涵体形式存在, GST 存在于超声上清

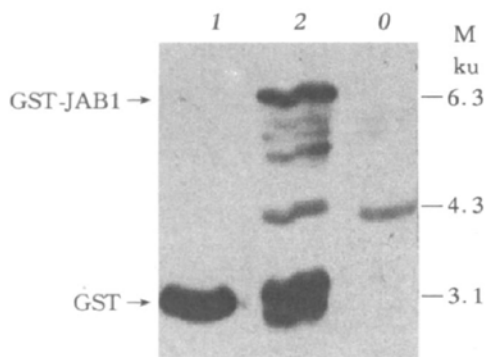


Fig 2 Identification of GST and GST fusion

BL21 cells (transformed with pGEX-4T-2 or pGEX-4T-2-JAB1) induced by 0.1 mmol/L IPTG for 7.5 hours were boiled about 20 min, then the BL21 cells extracts were resolved via SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane and immunoblotted with anti-GST antibody. 1: GST expression; 2: GST-JAB1 expression; 0: control (BL21).

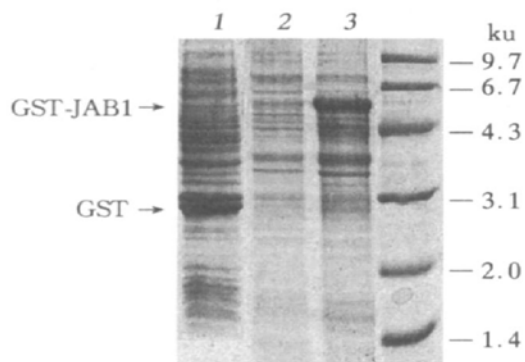


Fig 3 Expression of GST and GST-JAB1

BL21 cells (transformed with pGEX-4T-2 or pGEX-4T-2-JAB1) induced by 0.1 mmol/L IPTG for 7.5 hours were boiled about 20 min, then the BL21 cells extracts were resolved via SDS-PAGE and visualized by Coomassie blue staining. 1: GST expression; 2: control; 3: GST-JAB1 expression.

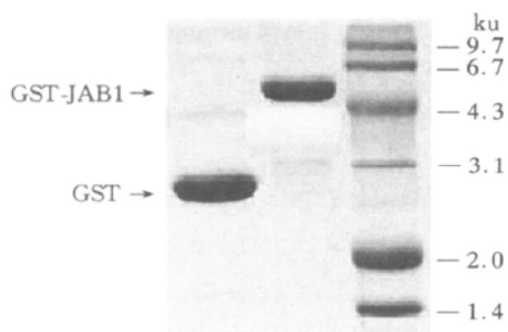


Fig 4 Purification of GST and GST-JAB1

GST within the sonication supernatant and GST-JAB1 by renaturation were applied to the affinity chromatography column respectively. The eluted proteins were resolved via SDS-PAGE and visualized by Coomassie blue staining.

中. 包涵体经裂解复性后上 2 ml glutathione-Sepharose 4B 床体积纯化柱纯化, 存在于超声上清中的 GST 直接上柱纯化. glutathione-Sepharose 4B 柱纯化结果见图 4.

2.3 MicroSpin GST 纯化柱结合效率

由表 1 可知 glutathione-Sepharose 4B 纯化柱结合效率较高, GST 结合效率 95% 以上, GST-JAB1 结合效率 90% 以上.

Table 1 MicroSpin GST purification column binding efficiency

Sample	Total protein/μg	Binding protein/μg	Binding efficiency/%
GST	100	97.3 ± 2.1 ¹⁾	> 95
GST-JAB1	100	95.0 ± 3.6 ¹⁾	> 90

¹⁾ indicates means ± s of three independent determinations.

2.4 蛋白质相互作用证明

为了证明 JAB1 与 HPO 是否在体外有结合作用, 采用蛋白质结合实验. 图 5 表明 GST-JAB1 结合 rHPO, 而不结合 rHPO 样品中混入的杂蛋白 (图 5 rHPO 样品道中低于 HPO 分子质量 1.5 ku 的一条带). 图 6 表明 GST-JAB1 结合 COS7 表达的

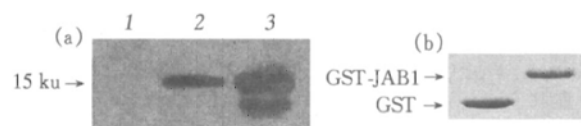


Fig 5 JAB1 binds to rHPO in vitro

rHPO were applied to columns of glutathione beads bearing GST or GST-JAB1. (a) The bound rHPO was eluted together with GST fusion, was separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF, and detected by anti-HPO antibody. (b) The GST and GST fusion bearing were visualized by Coomassie blue staining. 1: rHPO+ GST; 2: rHPO+ GST-JAB1; 3: rHPO.

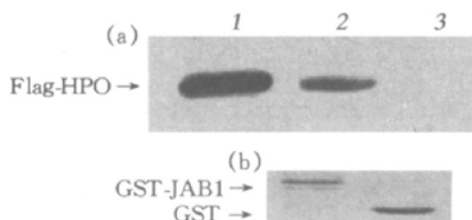


Fig 6 JAB1 binds to HPO expressed in COS7 cells in vitro

Whole cell extracts of COS7 cells transfected with pFLAG-HPO were applied to columns of glutathione beads bearing GST or GST-JAB1. (a) The bound flag-HPO was eluted together with GST-JAB1, was separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF, and detected by anti-flag antibody. (b) The GST and GST fusion bearing were visualized by Coomassie blue staining. 1: Flag-HPO; 2: Flag-HPO+ GST-JAB1; 3: Flag-HPO+ GST.

HPO (flag-HPO). 由于 GST 与 rHPO 和 flag-HPO 都没有结合作用, 因而表明 JAB1 与 HPO 之间有结合作用.

3 讨 论

肝脏再生作用具有极为复杂的调控机理^[6]. 目前已知有许多生长因子参与肝脏再生作用, 但是唯有 HPO 的作用对肝细胞具有特异性^[2]. 因此, 在肝脏再生作用中 HPO 可能起关键作用. 我们以前的研究表明, HPO 可以通过 EGF 受体激活 MAPK 信号转导通路^[1]. 那么, HPO 与 JAB1 在胞内的相互作用是否说明 HPO 具有双重信号转导途径, 这尚待深入研究.

最近有人报道, JAB1 是细胞内 COP9 (constitutive photomorphogenic 9) 多分子信号酶体 (signalosome) 亚单位之一^[7, 8]. 在植物和动物中, COP9 高度保守. 植物 COP9 参与光信号转导. 在动物细胞中也有证据表明 COP9 组件之一 JAB1 似乎参与信号转导作用, 如 LFA-1 信号转导和孕酮激素胞内信号转导^[9, 10]. COP9 在细胞内如同一个十字路口, 不同的信号分子通过 COP9 选择不同的信号传导途径. 因此, HPO 和 JAB1 在酵母细胞内及体外的结合作用提示, HPO 有可能通过 JAB1 在细胞内发挥重要生理作用, 或者 JAB1 对细胞内 HPO 的代谢、转运等机制有调节作用, 有关研究目前正在进行中.

参 考 文 献

- 1 Li Y, Hu Z Y, He F C, *et al.* HPO causes stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade after phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, 2000, **275** (48): 37443~37447
- 2 Wang G, Yang X M, He F C, *et al.* Identification and characterization of receptor for mammalian hepatopoietin that is homologous to yeast ERV1. *J Biol Chem*, 1999, **274** (17): 11469~11472
- 3 Susumu T, Toshinori O, Hidenori T, *et al.* Interaction of a neuron-specific protein containing PDZ domains with Alzheimer's amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, 1999, **272** (4): 2243~2254
- 4 Lowry I H, Rosebrough N J, Farr A L. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193** (1): 265~275
- 5 Francois-Xavier C, Maahiko H, Susheela D, *et al.* A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature*, 1996, **383** (6691): 453~457
- 6 Chandrashekhar R, Gandhi K, Vladimir M, *et al.* A fresh look at augmentor of liver regeneration in rats. *Hepatology*, 1999, **29** (5): 1435~1445
- 7 Ning W, Tomohiko T, Xing W D, *et al.* The COP9 complex is conserved between plants and mammals and is related to the 26S proteasome regulatory complex. *Current Biol*, 1998, **8** (16): 919~922
- 8 Shing F K, Roberto S, Tomoko T, *et al.* Arabidopsis homologs of a c-jun coactivator are present both in monomeric form and in the COP9 complex, and their abundance is differentially affected by the pleiotropic op. *det/fus* mutations. *Plant Cell*, 1998, **10** (51): 1779~1790
- 9 Anne C, Maria G, Mallory P W, *et al.* JAB1 interacts with the progesterone receptor and SRC-1. *J Biol Chem*, 2000, **275** (12): 8540~8548
- 10 Elisabetta B, Simona D, Alessandra G, *et al.* Integrin LFA-1 interacts with the transcriptional co-activator JAB1 to modulate AP-1 activity. *Nature*, 2000, **404** (6783): 617~621

Cloning of AP1 Coactivator JAB1 and Its Association with Hepatopoietin*

LU Cheng-Rong, LI Yong, DONG Chur-Na, LI Ming, WANG Qing-Ming, ZHANG Cheng-Gang

WEI Yu-Lin, CHEN Hu-Peng, HE Fu-Chu**

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract Using hepatopoietin (HPO) as "bait" in an yeast two-hybrid screen resulted in the identification of JAB1 (a protein initially as a co-activator of c-Jun) as a putative HPO binding partner. Then the full length cDNA of JAB1 was obtained from human fetal liver cDNA library by PCR for GST-JAB1 expression. The binding assay showed that JAB1 binded to rHPO and HPO expressed in COS7 cells *in vitro*.

Key words hepatopoietin, c-Jun activating-domain binding protein 1, activator protein 1

* This work was supported partially by Chinese National Natural Science Foundation Key Project (39830440), Chinese State Key Projects for Basic Research (G1998051122) and Chinese National Natural Science Foundation (30070171).

** Corresponding author. Tel: 86-10-66931246, E-mail: hefc@nic.bmi.ac.cn

Received: July 19, 2000 Accepted: September 28, 2000