

Nicastrin: 一种新型的 γ -分泌酶组成蛋白*

张春青 谌小维 胡志安**

(第三军医大学神经生物学教研室, 重庆 400038)

摘要 Nicastrin 属 I 型跨膜糖蛋白, 新近被证实为 γ -分泌酶复合体的组成部分. Nicastrin 可调节 γ -分泌酶复合体其他组分的稳定、转运等过程. Nicastrin 的主要功能是通过 γ -分泌酶复合体参与阿尔茨海默病中 $A\beta$ 生成和 Notch 信号系统转导.

关键词 nicastrin, γ -分泌酶, β 淀粉样蛋白, 阿尔茨海默病, Notch 信号系统

学科分类号 Q51

γ -分泌酶是一组重要的膜整合蛋白酶, 可以对多种底物进行代谢, 所以 γ -分泌酶的功能较为广泛, 在体内具有重要作用. 特别地, γ -分泌酶与阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的关系非常密切. 在 AD 的 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, $A\beta$) 生成过程中, γ -分泌酶的作用十分关键. 2000 年, Yu 等^[1]在纯化早老蛋白 (presenilin, PS) 片段时, 分离出了一种与 γ -分泌酶及 $A\beta$ 产生有关的重要蛋白质 nicastrin(NCT). Nicastrin 是以意大利的村庄 "Nicastro" 命名的, 人们在这里首次发现了 FAD 家族性阿尔茨海默病 (familial Alzheimer's disease, FAD) 家族. NCT 的 mRNA 广泛分布于人类或大鼠的所有细胞系. 在细胞水平, NCT 的分布和 PS1 的分布具有很大的重叠性, 绝大多数分布在高尔基器, 少部分分布在内质网以及其他结构^[2]. 本文将就 NCT 的研究进展作如下综述.

1 Nicastrin 的分子结构特点

1.1 Nicastrin 的基因表达与蛋白质修饰

编码人类 NCT 的基因定位于 1 号染色体 1q21.1, 处于 AD 易感性相关的区域. 通过与小鼠、果蝇、美丽线虫的 NCT 氨基酸序列的对比分析发现, 人类 NCT 三个有意义的保守区分别位于 306~360 位点、419~458 位点和 625~662 位点. 以上四类物种的 NCT 第一个保守区内均包含 DYIGS 基序 (aspartic acid-tyrosine-isoleucine-glycine-serine motif), 此基序在植物拟南芥 NCT 中也是部分保守的. 此外, 在 NCT 的 N 端每隔 16~17 个氨基酸残基就出现一次半胱氨酸残基, 共出现四次^[1].

成熟 NCT 属 I 型跨膜糖蛋白, 由 709 个氨基

酸残基组成, 糖链连接形式为 N 型, NCT 具有 16 个潜在的 N 型糖基化的位点, N-聚糖能结合在这些位点上. NCT 特征结构包括含有糖基化、N-豆蔻酰化和磷酸化基团的长 N 端亲水区域, 由 20 个残基构成的短亲水 C 端, 一个 N 端信号肽和一个由 20 个氨基酸构成的亲脂跨膜区. 细胞中 NCT 存在形式主要有三种, 分别是约 80 ku 的新生未糖基化的 NCT、约 110 ku 的未成熟 N 型糖基化 NCT (iNCT) 和约 150 ku 的成熟 N 型糖基化 NCT^[3]. 在神经元中发现, 未成熟的 NCT 是一种内切糖苷酶 -H- 敏感 (endo-H-sensitive) 的糖基化前体蛋白, 随后经历复杂的糖基化和唾液酸化后成为内切糖苷酶 -H- 抵抗 (endo-H-resistant) 的成熟 NCT. NCT 完全成熟大概需要 5 h, 成熟 NCT 活性维持时间相对较长, 半衰期超过 24 h^[4].

1.2 Nicastrin 的活性中心

研究提示, NCT 的 Asn263~Ala483 区域是其活性中心. 现已证实, NCT 中 Asp336~Ser340 序列即 DYIGS 基序为活性中心的催化区, DYIGS 基序对于 PS 和 NCT 之间的相互作用非常重要. 在不同物种的 NCT 中, 这段序列也是保守的. 人类 NCT 的 DYIGS 只能部分缓解美丽线虫的 aph-2 (人类 NCT 的等位基因) 突变导致的表型缺陷, 说明 NCT 的全部功能并不集中于这一结构域. NCT 活性中心有一个与氨肽酶超家族成员类似的折叠区, 表明 NCT 活性中心亦属于氨肽酶超家族.

*国家自然科学基金资助项目(30370465).

** 通讯联系人.

Tel: 023-68753704, E-mail: zhianhu@126.com

收稿日期: 2005-05-20, 接受日期: 2005-06-28

此外, 研究发现 NCT 的胞质尾端对 γ -分泌酶复合体的组装及其功能的发挥是必不可少的, 胞质尾端包括由 20 个氨基酸构成的亲脂跨膜结构域及其紧邻的区域. NCT 通过其跨膜结构域与 γ -分泌酶复合体中的其他组分发生相互作用^[9].

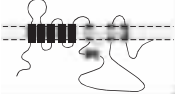
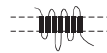
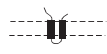
2 Nicastrin 与 γ -分泌酶

2.1 Nicastrin 是 γ -分泌酶复合体的重要组成成分

早期推测 PS 可能就是 γ -分泌酶, 但 NCT 的发现否定了这一假说. 最近大量研究发现, γ -分泌酶是一组复杂的多亚基复合体, NCT、Aph-1、Pen-2 和 PS 四种蛋白质都是 γ -分泌酶的组成成分,

其中 PS 中存在 γ -分泌酶的蛋白质水解活性位点, 其他三种蛋白质为其辅因子, 只有四种物质同时表达, 才能使 PS 更加稳定和增加完全糖基化的 NCT 表达, 并且使分泌酶的活性显著增强. 酵母菌中没有内源性 PS、NCT、Aph-1 及 Pen-2, 向酵母菌中表达人类 NCT、PS1、Aph-1 和 Pen-2, 并导入 γ -分泌酶的底物, 可以观察到底物的降解, 该现象强有力地说明了 NCT、PS、Aph-1 和 Pen-2 完全可以构成具有活性的 γ -分泌酶^[6,7]. γ -分泌酶中各个组分的结构及功能见表 1^[9].

Table 1 The components of the γ -secretase complex
表 1 γ -分泌酶复合体的组分及其功能

γ -分泌酶复合体组分	氨基酸数目	线虫	哺乳动物	功能
PS 	PS1 467 PS2 448	HOP-1, SEL-12	PS1, PS2	具有催化亚基, 并参与 γ -分泌酶的组装(NCT 的糖基化, Pen-2 的表达); β -catenin 磷酸化
NCT 	709	Aph-2	NCT	参与 γ -分泌酶的组装(稳定 PS 和 Pen-2)
Aph-1 	257	Aph-1(Pen-1)	Aph 1aL, Aph 1aS; Aph 1b	参与 γ -分泌酶的组装(稳定 PS/NCT)
Pen-2 	101	Pen-2	Pen-2	参与 γ -分泌酶的组装(与 PS 蛋白水解有关)

PS: 早老蛋白 presenilin; NCT: nicastrin.

构成 γ -分泌酶的组分绝大多数定位于高尔基 / 高尔基器反面网络结构 (trans Golgi network, TGN), 并在此进行组装^[8]. 一般认为, γ -分泌酶的组装主要存在两种可能的模式. 一种可能是, 在 γ -分泌酶早期组装过程中, NCT 与 Aph-1 首先形成一个亚复合体, 亚复合体中未成熟的 NCT 在内质网中进行 N 型糖基化, 随后部分新生的 PS 全蛋白与这个亚复合体发生作用从而形成第二级的过渡态复合体, 最后 Pen-2 进入该复合体对 PS 全蛋白进行蛋白质水解, 使 PS 形成异二聚体, 并最终使 γ -分泌酶完全成熟^[6] (图 1 a). 然而, 由于目前尚无研究观察到 Pen-2 进入 γ -分泌酶复合体的具体时相, 并且有研究认为 PS 全蛋白加入 γ -分泌酶复合体后将 Aph-1 置换出 γ -分泌酶复合体, 因此有人提出了另一种组装模式^[9] (图 1 b).

2.2 Nicastrin 与 γ -分泌酶其他组分的相互作用

Yu 等在纯化 PS 时分离出了 NCT, 这表明

NCT 和 PS 之间存在相互作用. PS 在 NCT 翻译后修饰、亚细胞水平的分布及保持 NCT 的稳定性方面均发挥重要作用. 在 PS1 和 PS2 缺失时, 初级的 NCT 不能到达高尔基器中间膜囊, 因此不能完成末端糖基化的成熟过程. 此外, 可以推测 NCT 经历了一个依赖 PS1 的构象改变, 如蛋白质折叠过程, 未完全折叠的和未完全成熟的 NCT 蛋白滞留在内质网中, 随后被缓慢降解. PS1 和 PS2 在 NCT 成熟过程中的作用并不相同. 在 PS1 缺乏的鼠中, 所有形式的 NCT 表达水平均显著地降低, 其中最明显的是成熟的 N 型糖基化 NCT 的减少. 在 PS2 缺失的鼠中, 成熟 NCT 表达水平的降低并不是很明显, 而主要是 iNCT 的减少. 因为在 PS2 缺失的个体内, PS1 能够作用于 iNCT, 转化出接近正常水平的成熟 NCT. 相反, 仅凭 PS2 自身并不能使 NCT 完全成熟^[10].

另一方面, NCT 与 PS 的表达、稳定及转运有

关. 用 RNA 抑制剂耗竭内源性的 NCT 后发现, 无论内源性的或转染的 PS 蛋白均完全消失, 而此时 PS 的 RNA 表达水平无异常, 表明 NCT 对蛋白质水平的 PS 起稳定作用. 缺少了 NCT, γ -分泌酶的其他组分主要定位于内质网, PS 在内质网中堆积,

此时异位的 PS 很快被降解. 当细胞中过度表达 PS 时, 由于 NCT 等调节因子的相对不足, 限制其代谢过程, 造成 PS 全蛋白的堆积. 此外, 在 NCT 敲除细胞的质膜上, 发现了一定数量的 PS1, 表明尚存在不依赖于 NCT 的 PS 转运机制^[1].

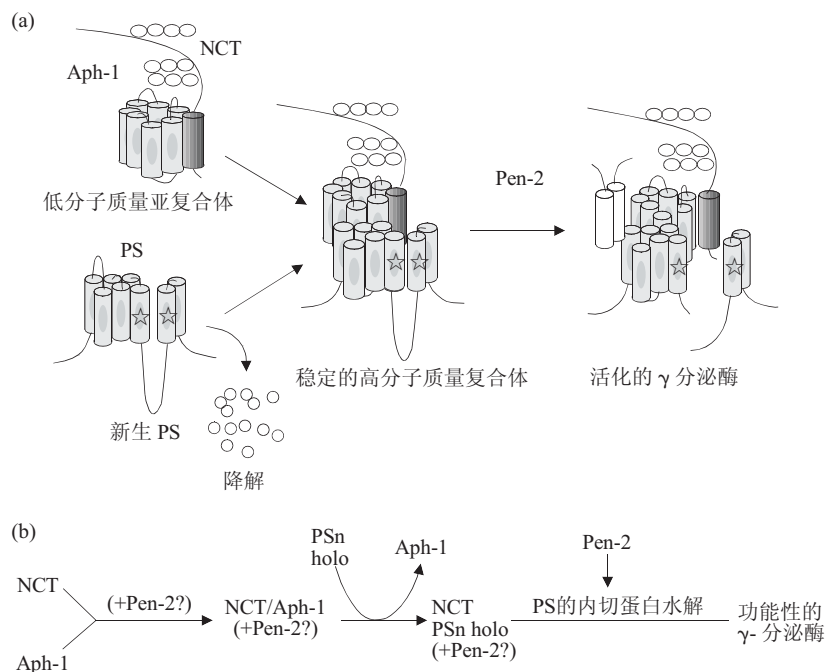


Fig.1 The scheme of the formation of the γ -secretase complex

图 1 γ -分泌酶复合体组装示意图

(a) γ -分泌酶复合体组装及活化假设模式之一^[6]. 图中的管状结构代表蛋白质的跨膜结构域; 标记于 PS 第 6/7 个跨膜结构域的星型图标代表参与 γ -分泌酶活性的两个天冬氨酸残基, 空心表示有活性, 实心表示无活性. (b) γ -分泌酶复合体组装及活化的另一种假设模式^[9]. PSn holo: PS 全蛋白.

对成熟的 γ 分泌酶进行洗脱后, 发现 Aph-1 和 NCT 之间存在直接的蛋白质-蛋白质相互作用. 研究观察到 NCT 和 Aph-1 形成的亚复合体的分子量约为 140 ku, 这与 iNCT 及 Aph1 的分子量之和相一致. 在线虫中下调 Aph-1 的表达, 将导致 Aph-1/NCT 亚复合体的错误定位. 而 Aph-1 某些基序的突变将影响 Aph-1/NCT 亚复合体同 PS 的结合, 并影响此三聚体向高尔基器的转运^[12].

在 NCT 敲除的胚胎纤维母细胞中, Pen-2, Aph-1 和 PS1 的表达水平均明显下降, 其中降低的 Pen-2 表达水平能被过度表达的 PS1, Aph-1 部分恢复, 表明在 Pen-2 表达水平的调节过程中, NCT 并不是必需的. NCT 缺失后, Pen-2 和累积的 PS1 被蛋白酶降解. 而当 Pen-2 发生突变时, NCT 的成熟过程将受阻^[11].

3 Nicastrin 的功能

3.1 Nicastrin 在调节 A β 生成中的作用

A β 是由淀粉样前体蛋白 (amyloid protein precursor, β APP) 分解而来, 有三种酶, α -分泌酶、 β -分泌酶、 γ -分泌酶参与了 APP 的切割过程. A β 定位于 APP 中的 597~640 位点. α -分泌酶裂解 APP 时, 作用位点位于 APP 上 A β 段内部, 可产生 100 ku 的 β APP-N 端和 9 ku 的 β APP-C 端, 而不产生 A β 片段. β -分泌酶主要裂解 APP 胞膜外的 N 端, 产生 APP C 端产物 C99/C83- β APP; γ -分泌酶主要裂解由 β 切割产生的 APP C 端产物 C99/C83- β APP, 在 β -分泌酶、 γ -分泌酶共同切割下产生 A β 片段.

过度表达的 NCT 可以增加 A β 的生成, 但不

改变 PS1 表达水平, 由于 γ -分泌酶的切割活性位点位于 PS 蛋白上, 因此 NCT 的过度表达并没有增强 γ -分泌酶的切割活性, 故当时有学者提出, 过度表达的 NCT 可能是通过调节底物进入 γ -分泌酶复合体来发挥作用的^[13]. 最近研究证实, NCT 的确具有识别和结合 γ -分泌酶底物的功能, NCT 的胞外功能区可以识别 I 型跨膜糖蛋白被切割后产生的氨基残端, 从而识别并结合这类糖蛋白作为底物, 因此也将 NCT 的胞外功能区称为 γ -分泌酶的“底物受体”^[14]. γ -分泌酶的底物在进入 γ -分泌酶的活性位点前, 已经与 NCT 进行初步的结合. 这种结合受 PS 基因突变的调节, PS 的 FAD 突变增强 NCT 与底物片段 C99/C83- β APP 的结合能力, 从而促进 A β 的产生. PS 的天冬氨酸突变的作用相反, 即抑制 A β 的产生.

此外, NCT 对 γ -分泌酶的活性既有正性调节又有负性调节, 如某些 NCT 的突变株 (如 Δ 312~369) 可以减少 A β 的产生, 而某些突变 (如 D336A/Y337A) 则增加 A β 的产生^[15].

3.2 Nicastrin 在 Notch 信号系统中的作用

Notch 信号系统是后生动物门动物中一条进化保守的信号途径, 在个体生长发育过程中影响细胞分化、增殖及凋亡, 决定细胞的命运. Notch 的分子结构与 β APP 类似, 是一种大分子 I 型跨膜糖蛋白, 被 γ -分泌酶切割后产生胞内结构域 (Notch intracellular domain, NICD), NICD 移位到细胞核触发 Notch 信号传导级联反应.

对美丽线虫进行 NCT 基因 (*aph-2*) 敲除后, 其产生的表型与 Notch 信号系统基因活性降低所产生的表型相同, 而且人类的 NCT 可以部分缓解美丽线虫中 *aph-2* 突变产生的后果, 这直接说明了 NCT 与 Notch 之间存在相互作用. 抗-NCT 免疫共沉淀研究发现, 沉淀产物中含有膜结合 Notch 和膜结合 β APP (包括整条 β APP 以及 C99/C83- β APP), 但没有 NICD. 野生型和突变型的 NCT 可结合相同量的膜结合 Notch, 但缺失突变 (Δ 312~340 或 Δ 312~369) 降低 NICD 的产生; 突变株 D336A/Y337A 可增加 NICD 的产生.

γ -分泌酶抑制剂对 Notch 信号系统的影响明显小于对 β APP 切割的影响. 虽然 γ -分泌酶对 C99/C83- β APP 与膜结合 Notch 的处理途径相似, 但 NCT 突变株导致的 NICD 与 A β 分泌量相比之下却存在很大悬殊. 已知共表达的 Notch 与 β APP 片段对 γ -分泌酶不存在竞争机制, γ -分泌酶的活

性也不具有饱和性, 由此推断 Notch 和 β APP 可能在 γ -分泌酶中的不同部位发生作用^[16]. 体内的 NCT/Aph-2 低浓度表达将中断 Notch 信号系统的传导, 但 NCT 活性中心的缺失突变 (Δ 312~369) 对 Notch 处理的影响则较小, 说明在 Notch 处理过程中, NCT 是不可或缺的, 但作为活性中心的 312~369 结构域 (其中包括 DYIGS 基序) 并非必需的, 这就为 AD 的治疗提供了新思路, 即可利用药物选择性地作用于此结构域, 控制 A β 产生而不影响体内 Notch 信号途径的传导^[3]. 最近研究发现, 糖原合酶激酶-3 β 的抑制剂锂离子达到治疗浓度时, 可以阻断 A β 的产生, 同时并不影响 Notch 信号系统的传导^[17].

除上述主要功能外, NCT 还参与了神经发生的过程. NCT 在神经发生中的功能是通过调节 PS1 的稳定、成熟、转运来实现的. PS 是 γ -分泌酶复合体中发挥蛋白质切割活性的组分, PS 通过 γ -分泌酶复合体对 APP 处理后, 产生 APP 的胞内结构域 (intracellular domain of APP, AICD), AICD 与一系列核内蛋白质发生作用, 启动目标基因, 调节磷酸肌醇介导的钙信号系统, 最终通过对钙稳态的调节进而调节神经发生过程^[18].

4 展 望

综上所述, NCT 的发现是 γ -分泌酶研究的一个突破, 目前 NCT 的研究已经取得了一定进展. 但仍有诸多问题有待解决, 如 NCT 与 γ -分泌酶中其他组分的具体作用方式, NCT 作为跨膜蛋白的代谢途径以及影响其功能表达的因素等. 我们相信, 随着研究的深入, NCT 的分子机制及功能将得到进一步的阐明, 为成功利用 NCT 做为预防及治疗 AD 的新靶点提供理论基础. 同时也可利用 NCT 对 Notch 信号途径的调节来决定细胞的命运, 进而可能为调节神经发育和肿瘤的治疗提供有效途径.

参 考 文 献

- 1 Yu G, Nishimura M, Arakawa S, *et al.* Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and β APP processing. *Nature*, 2000, **407** (6800): 48~54
- 2 Confaloni A, Crestini A, Albani D, *et al.* Rat nicastrin gene: cDNA isolation, mRNA variants and expression pattern analysis. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005, **136** (1~2): 12~22
- 3 De-Strooper B. Aph-1, Pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active gamma-secretase complex. *Neuron*, 2003, **38** (1): 9~12
- 4 Herreman A, Van-Gassen G, Bentahir M, *et al.* gamma-Secretase activity requires the presenilin-dependent trafficking of nicastrin

- through the Golgi apparatus but not its complex glycosylation. *J Cell Sci*, 2003, **116** (Pt 6): 1127~1136
- 5 Capell A, Kaether C, Edbauer D, *et al.* Nicastrin interacts with γ -secretase complex components *via* the N-terminal part of its transmembrane domain. *J Biol Chem*, 2003, **278** (52): 52519~52523
 - 6 Iwatsubo T. The gamma-secretase complex: machinery for intramembrane proteolysis. *Curr Opin Neurobiol*, 2004, **14** (3): 379~383
 - 7 Zhang L, Lee J, Song L, *et al.* Characterization of the reconstituted gamma-secretase complex from Sf9 cells co-expressing presenilin 1, nicastrin, Aph-1a, and Pen-2. *Biochemistry*, 2005, **44** (11): 4450~4457
 - 8 Kim S H, Yin Y I, Li Y M, *et al.* Evidence that assembly of an active γ -secretase complex occurs in the early compartments of the secretory pathway. *J Biol Chem*, 2004, **279** (47): 48615~48619
 - 9 Hu Y, Fortini M E. Different cofactor activities in γ -secretase assembly: evidence for a nicastrin-Aph-1 subcomplex. *J Cell Biol*, 2003, **161** (4): 685~690
 - 10 Chen F, Tandon A, Sanjo N, *et al.* Presenilin 1 and Presenilin 2 have differential effects on the stability and maturation of nicastrin in mammalian brain. *J Biol Chem*, 2003, **278** (22): 19974~19979
 - 11 Zhang Y W, Luo W J, Wang H, *et al.* Nicastrin is critical for stability and trafficking but not association of other Presenilin/ {gamma}-secretase components. *J Biol Chem*, 2005, **280** (17): 17020~17026
 - 12 Niimura M, Isoo N, Takasugi N, *et al.* Aph-1 contributes to the stabilization and trafficking of the gamma-secretase complex through mechanisms involving intermolecular and intramolecular interactions. *J Biol Chem*, 2005, **280** (13): 12967~12975
 - 13 Murphy M P, Das P, Nyborg A C, *et al.* Overexpression of nicastrin increases Abeta production. *FASEB J*, 2003, **17** (9): 1138~1140
 - 14 Shah S, Lee S F, Tabuchi K, *et al.* Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell*, 2005, **122** (3): 435~447
 - 15 Li J, Fici G J, Mao C A, *et al.* Positive and negative regulation of the γ -secretase activity by nicastrin in a murine model. *J Biol Chem*, 2003, **278** (35): 33445~33449
 - 16 Kopan R, Goate A. Aph-2/Nicastrin: an essential component of gamma-secretase and regulator of Notch signaling and Presenilin localization. *Neuron*, 2002, **33** (3): 321~324
 - 17 Phiel C J, Wilson C A, Lee V M, *et al.* GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature*, 2003, **423** (6938): 435~439
 - 18 Sarkar S N, Das H K. Regulatory roles of presenilin-1 and nicastrin in neuronal differentiation during *in vitro* neurogenesis. *J Neurochem*, 2003, **87** (2): 333~343

Nicastrin: a New Protein Component of γ -Secretase*

ZHANG Chun-Qing, CHEN Xiao-Wei, HU Zhi-An**

(Department of Neurobiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Nicastrin is a novel type I transmembrane glycoprotein, which has been shown to be a critical component of γ -secretase complex. It has been well established that nicastrin is essential for the stability and trafficking of the other γ -secretase components. Furthermore, nicastrin plays an important role in A β peptide generation of Alzheimer's disease and Notch signaling pathway.

Key words nicastrin, γ -secretase, β -amyloid, Alzheimer's disease, Notch signaling

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30370465).

**Corresponding author. Tel: 86-23-68753704, E-mail: zhianhu@126.com

Received: May 20, 2005 Accepted: June 28, 2005