

鼻咽癌下调新基因 NOR1 相互作用蛋白
的筛选和鉴定*向波^{1)**} 王理^{1)**} 易梅^{2)**} 欧阳珏¹⁾李夏雨¹⁾ 张祖萍¹⁾ 李小玲¹⁾ 李桂源^{1)***}⁽¹⁾中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078; ⁽²⁾中南大学湘雅医院皮肤科, 长沙 410078)

摘要 NOR1 基因是新的鼻咽癌相关基因, 该基因在鼻咽癌细胞系 HNE1 和鼻咽癌组织中表达下调. 在鼻咽癌细胞 HNE1 中恢复 NOR1 基因表达抑制了鼻咽癌细胞的生长和增殖能力. 为了探讨 NOR1 基因的生物学功能, 以 NOR1 基因为诱饵运用酵母双杂交技术在人胎脑文库中筛选其交互作用蛋白, 挑选阳性克隆, 进行 DNA 序列分析和同源检索, 阳性克隆编码 7 个不同的蛋白质, 其中一个阳性克隆编码线粒体 ATP 合成酶亚基 OSCP 蛋白. 瞬时转染 pCMV-myc-NOR1 质粒进入鼻咽癌 5-8F 细胞, 通过密度梯度离心法分离线粒体蛋白, Western blot 检测表明 myc-NOR1 蛋白分布于线粒体与胞浆. 免疫荧光检测表明在鼻咽正常上皮细胞 NP69 中内源性 NOR1 蛋白与线粒体存在明显共定位. 随后采用特异性酵母双杂交、免疫荧光共定位、免疫共沉淀技术证实了 NOR1 与 OSCP 在线粒体内存在交互作用. 提示, NOR1 是一个新的线粒体蛋白, 可能通过结合 OSCP 蛋白调控细胞能量代谢, 为深入探讨其功能提供了重要线索.

关键词 NOR1, 酵母双杂交, OSCP, 蛋白质相互作用

学科分类号 Q71, Q291

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00684

NOR1(oxidoredo-nitro domain containing protein 1) 基因是首先从鼻咽癌中克隆得到的一个新基因, 其编码一个相对保守的蛋白, 包含一个潜在的硝基还原酶结构域^[1]. 该基因在鼻咽癌组织及鼻咽癌细胞系中广泛下调, NOR1 基因编码区 2 个偶联的 cSNPs(coding region single nucleotide polymorphism) 与鼻咽癌发病相关, 可能是一个化学因素致鼻咽癌相关基因^[2,3]. 前期研究发现, 在鼻咽癌细胞系中恢复 NOR1 的表达能够抑制鼻咽癌细胞的生长与增殖, 部分逆转鼻咽癌细胞的恶性表型^[4]. 酵母双杂交系统作为研究蛋白质相互作用的一种新的强而有力的技术^[5], 目前已被广泛应用于生物研究各个领域如细胞信号传导、细胞周期调控、基因转录和翻译调控等. 为了寻找 NOR1 基因的功能线索, 我们采用酵母双杂交系统来筛选 NOR1 蛋白的交互作用蛋白, 首次筛选得到 7 个 NOR1 基因的候选交互作用蛋白, 包括金属硫蛋白 2A(MT2A)、BPY2 相互作用蛋白 1 (BPY2IP1)、细胞间黏附分子 ICAM5、线粒体 ATP 合成酶亚基 OSCP、羧肽酶 E(CPE)、补体 C2 和 CRIM2. 在鼻咽癌 5-8F 细

胞系中瞬时表达 NOR1, NOR1 蛋白定位于线粒体和胞浆. 通过特异性酵母双杂交以及免疫荧光共定位、免疫共沉淀技术, 证实了 NOR1 与 OSCP 在线粒体内发生相互作用.

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌(*E. coli*) JM109 为中南大学肿瘤研究所保存菌种. HeLa 细胞系、人正常鼻咽上皮细胞系 NP69、鼻咽癌细胞系 5-8F 为中南大学肿瘤研究所保存; 酵母菌株 (*S. cerevisiae*) AH109 购自 Clontech 公司; 酵母双杂交系统及人胎脑 MATCHMAKER cDNA 文库购自 Clontech 公司;

* 国家重点基础研究发展计划(2006cb910502), 111 计划(111-2-12)和国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2007AA02Z170).

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 0731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

收稿日期: 2008-10-07, 接受日期: 2009-04-08

所有的酵母培养基购自 Clontech 公司; Pyrobest DNA 聚合酶、dNTP、限制性内切酶等购自大连宝生物公司; T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 线粒体染料 MitoTracker Red CMXRos 为 Molecular Probe 公司产品, 使用浓度为 100 nmol/L; 兔抗人 NOR1 多克隆抗体为自制抗体(另文报道); anti-OSCP、anti- α -tubulin 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; Anti-VDAC 多克隆抗体、FITC 标记羊抗兔 IgG 和 Cy3 标记羊抗小鼠 IgG 购自 Sigma 公司; 卡尔·蔡司激光共聚焦显微镜(LSM 5 PASCAL)。

1.2 方法

1.2.1 诱饵载体构建. 根据 NOR1 基因的酶切图谱和 pGBKT7 的多克隆位点, 选用 *Nde* I 和 *Sal* I 作为克隆位点, 根据 NOR1 基因完整开放阅读框序列的两端设计含 *Nde* I 和 *Sal* I 酶切位点的引物(F, 5' ATACATATGTCGGTGCACGTTACCG 3'; R, 5' TTTGTCGACCTATAACTCATCCATCATGGCGAG 3'), 扩增含有 NOR1 基因完整阅读框的序列, 使 GAL4 BD 基因的编码框与 NOR1 基因完全吻合, 再经上述酶修饰与 pGBKT7 重新连接, 酶切鉴定和测序验证。

1.2.2 酵母双杂交筛选人胎脑 cDNA 文库. 根据 Y2H 操作手册将诱饵质粒与人胎脑 cDNA 文库共转化酵母 AH109 感受态细胞, 在高选择性培养基 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平皿中 30℃ 培养 3~5 天后, 可见菌落生长。挑选直径大于 2 mm、生长旺盛的转化子, 接种在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 培养基中, 生长 3~5 天后, 采用硝酸纤维素膜克隆印迹 β -gal 检测, 收集阳性菌落, 并在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 液体培养基中复选并小量扩增, 抽提酵母质粒, 再转化至大肠杆菌 JM109 中, 采用 Amp⁺ 平皿筛选, 抽提质粒, 此时抽提得到的仅为 pACT2-pray 质粒, 送测序, 测序结果进行 BLAST 搜索, 并验证候选基因的阅读框是否与 GAL4 AD 阅读框融合。

1.2.3 pGBKT7-NOR1 与 pACT2-OSCP 特异性双杂交. 将 pGBKT7-NOR1 与筛选得到的 pACT2-OSCP 质粒共转化酵母感受态细胞, 接种在 SD/-Leu/-Trp 培养基, 待克隆长至直径大于 2 mm 后选择数个克隆小量扩增, 划线接种在筛选培养基 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal 平皿, 30℃ 培养 3~5 天后, 观察阳性克隆生长与显色。

1.2.4 荧光共定位. 将 GFP-NOR1 质粒与

myc-OSCP 表达载体共转染 HeLa 细胞, 培养 24~48 h, 丙酮: 甲醇(1:1)固定, 0.25% Triton X-100 破膜, 10% 正常羊血清封闭非特异性结合位点, c-myc 抗体孵育过夜, PBS 冲洗, Cy3 标记的羊抗小鼠 IgG 孵育 1 h, PBS 冲洗后共聚焦显微镜观察并照相。另外, 采用内源性 NOR1 抗体和 OSCP 抗体检测内源性 NOR1 与 OSCP 在人鼻咽正常上皮细胞系 NP69 细胞中的表达与定位。线粒体染料标记参照产品 Protocol 进行。

1.2.5 基因转染、线粒体分离及免疫共沉淀. 采用 Lipofectamine 2000 瞬时转染 pCMV-myc 空载体和 pCMV-myc-NOR1 质粒入鼻咽癌细胞系 5-8F 细胞, 培养 24~48 h 后收获细胞, 用 PBS 漂洗细胞 3 次, 然后将细胞刮下, 离心收集细胞, 参照文献[6]采用蔗糖密度梯度离心法(0.25 mol/L 蔗糖, 20 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.5, 10 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PMSF)分离线粒体和胞浆组分蛋白, SDS-PAGE, Western blot 采用 c-myc 单克隆抗体检测 NOR1 蛋白在胞浆和线粒体中的表达。按照上述方法转染细胞, 分离线粒体, 根据文献[7]采用 20 mmol/L n-dodecyl- β -D-maltopyranoside/PBS(1% lauryl maltoside)温和裂解线粒体, 冰浴 30 min, 16 000 g 离心 30 min, 取上清, 即为线粒体蛋白, BCA 法蛋白质定量, 取两等分(100 μ g)用于免疫沉淀。分别加入 anti-OSCP 单克隆抗体(2 mg/L)或等量正常小鼠 IgG, 4℃ 过夜, 加入 100 μ l 葡萄球菌 G-Plus-A 蛋白(protein G-Plus-A)偶联的 Sepharose(Calchemical), 4℃ 摇床振荡 1 h, 3 000 r/min 离心 5 min, 利用线粒体裂解液洗涤沉淀物 4 次, 3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀经 SDS-PAGE, Western blot 采用 c-myc 单克隆抗体检测 myc-NOR1 蛋白。

2 结果与讨论

2.1 诱饵质粒的构建和自转录活性分析

采用 Pyrobest DNA 聚合酶从人胎脑 cDNA 文库中扩增得到 NOR1 基因完整开放阅读框(open reading frame, ORF), 长 1 170 bp, 两端分别携带 *Nde* I 和 *Sal* I 酶切位点, 与 pGBKT7 载体连接, 转化大肠杆菌 JM109, 抽提质粒 *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定, 阳性克隆送测序鉴定, 结果显示, NOR1 ORF 与 GAL4 BD 融合, 构建成功诱饵质粒, 命名为 pGBKT7-NOR1。将构建好的诱饵载体

与 pACT2 质粒共转化酵母 AH109 感受态细胞, 转化子能够在 SD-Trp/-Leu 平皿上生长, 且菌落 > 2 mm, 说明 NOR1 蛋白表达对酵母细胞没有明显毒性. 转化子不能在高选择性 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-gal 平皿中生长, 说明 NOR1 基因本身没有转录活性, 可用于下一步文库筛选.

2.2 cDNA 文库的筛选和阳性克隆的鉴定

通过酵母双杂交筛选人胎脑 cDNA 文库, 在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平皿上共挑选得到 46 个 Ade⁺/His⁺/Mel1⁺ 候选克隆, 进行两轮 β-gal 检测, 得到 21 个明显蓝色克隆(图 1). 其中 13 个克隆电转化大肠杆菌 JM109 成功, 获得 pray AD-Y 质粒, 将 13 个 pray AD-Y 质粒与空白 pGBKT7 质粒共转化 AH109 感受态细胞, 置于 SD-Trp/-Leu 培养基上培养, 并进行 β-gal 检测, 其中有 2 个转化子呈明显蓝色, 1 个为弱蓝色, 属于自身转录激活, 故该 3 个克隆弃去. 其余 10 个克隆质粒送测序并经阅读框验证发现编码 7 个基因, 见表 1. 其中, 筛选得到的 MT2A (metallothionein 2A) 和 OSCP

(oligomycin sensitivity conferring protein)克隆包含全长 ORF(open reading frame), 另外 5 个候选克隆编码相应蛋白的一部分肽段.

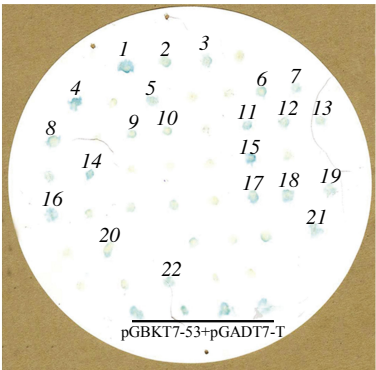


Fig. 1 Clony-lift filter assay of positive clones interactive with NOR1
Ade⁺/His⁺/Mel1⁺ clones were picked and plated on SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp plate, incubated in 30℃ for 3~4 day. Replica plate was used to clony-lift filter assay with X-gal. Blue clones (1~22) represent positive clones. pGBKT7-53+pGADT7-T is positive control for yeast two-hybrid assay.

Table 1 BLAST results of 10 positive clones by screening human fetal brain cDNA library with NOR1 as bait

Gene name	Homology	Encoded protein	Clone numbers
MT2A(full length)	100%	Metallothionein 2A	3
BPY2IP1(787~1059aa)	100%	Homo sapiens BPY2 interacting protein 1	1
C2(129~752aa)	100%	Complement component 2	1
CPE(395~446aa)	100%	Carboxypeptidase E	1
OSCP(full length)	100%	Oligomycin sensitivity conferring protein	1
ICAM5(711~868aa)	100%	Intercellular adhesion molecule 5, telencephalin	2
CRIM2(1187~1403aa)	100%	Cysteine rich BMP regulator 2 (chordin-like)	1

2.3 NOR1 表达于线粒体并与 OSCP 存在交互作用

筛选得到的 OSCP 蛋白是线粒体 ATP 合成酶的亚基, 定位于线粒体, 这提示我们 NOR1 有可能也定位于线粒体. 瞬时转染 pCMV-myc-NOR1 质粒入鼻咽癌细胞系 5-8F 细胞, 通过密度梯度离心方法分离得到线粒体和胞浆蛋白组分, SDS-PAGE、免疫印迹结果显示, myc-NOR1 (43 ku)同时表达于胞浆与线粒体(图 2). 为了直接观察 NOR1 蛋白是否定位于线粒体, 我们采用 Molecular Probe 公司线粒体染料 MitoTracker Red CMXRos 标记正常人鼻咽上皮细胞系 NP69 细胞线粒体, 然后通过免疫荧光技术检测内源性 NOR1 蛋白在细胞内的定位, 结果显示, NOR1 蛋白与线

粒体标记荧光存在明显共定位(图 3), 说明内源性 NOR1 蛋白是一个定位于线粒体的蛋白.

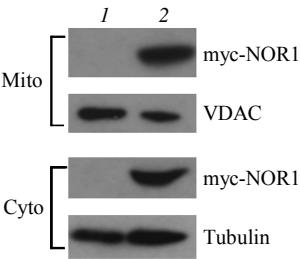


Fig. 2 Exogenous expressed NOR1 protein distributes in mitochondria and cytoplasma
1 and 2 represent 5-8F cells transfected with empty vector pCMV-myc plasmid and pCMV-myc-NOR1 plasmid, respectively. Mito: Mitochondrial fraction; Cyto: Cytoplasmic fraction. VDAC: Voltage dependent anion channel; Tubulin: α-tubulin.

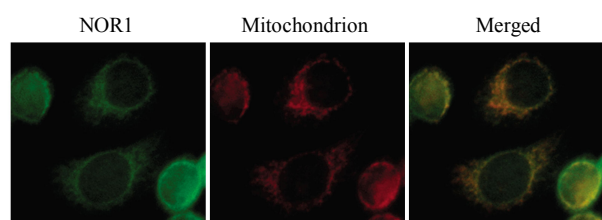


Fig. 3 Endogenous NOR1 protein locates in mitochondrion
NP69 cells were stained with MitoTracker Red CMXRos (red) for 45 min at 37°C, then the cells were fixed. NOR1 protein was probed with rabbit Anti-NOR1 primary antibody and Goat anti-rabbit IgG/FITC. Green indicates the location of NOR1 protein expression. Red indicates the location of mitochondrion. Yellow represents merged location of NOR1 protein and mitochondrion.

2.4 NOR1 与 OSCP 在线粒体内发生交互作用

NOR1 蛋白表达于线粒体, 提示从蛋白质表达的空间位置上来说, NOR1 具备与 OSCP 在线粒体内发生相互作用的机会. 为了鉴定酵母双杂交的结果, 首先将 pGBKT7-NOR1 与 pACT2-OSCP 质粒共转 AH109, 同时以 pGBKT7-NOR1 + pACT2 和 pGBKT7-NOR1 + pACT2-OSCP 为自身对照, 以 pGBKT7-53 + pGADT7-T 为阳性对照. 将转化子涂板 SD/-Leu/-Trp 平板, 30°C 培养 3~5 天后至菌落直径 >2 mm, 每种转化子挑选数个菌落划线接种于 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-αGal, 30°C 培养 3~5 天, 结果如图 4 所示. pGBKT7-NOR1 与 pACT2-OSCP 质粒共转的转化子能在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-αGal 培养基中生长, 且克隆生长旺盛, 呈蓝色,

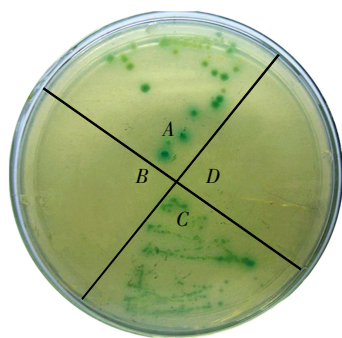


Fig. 4 Specific yeast two-hybrid assay of interaction between NOR1 and OSCP

The yeast cotransformants were striped onto SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-αGal media, incubated in 30°C for 3~4 days. Blue clones represent positive clones. A represent AH109 cells co-transformed with pGBKT7-53 and pGADT7-T, which serve as positive control for yeast two-hybrid assay; B represent AH109 cells co-transformed with pGBKT7-NOR1 and pACT2; C represent AH109 cells co-transformed with pGBKT7-NOR1 and pACT2-OSCP; D represent AH109 cells co-transformed with pGBKT7 and pACT2-OSCP.

而 pGBKT7-NOR1 + pACT2 以及 pGBKT7-NOR1 + pACT2-OSCP 转化子均不能在筛选培养基中生长, 说明 NOR1 与 OSCP 的确在酵母中存在直接特异性交互作用. 为了证明两者在哺乳动物细胞内存在交互作用, 首先将 GFP-NOR1 质粒与 myc-OSCP 质粒瞬时共转染 HeLa 细胞, 免疫荧光观察到两者存在明显共定位, 呈点状特征(图 5a). 随后应用自制的 anti-NOR1 多克隆抗体与 anti-OSCP 单克隆抗体进行免疫荧光检测, 发现内源性 NOR1 与 OSCP 蛋白在 NP69 中存在共定位(图 5b), 提示内源性

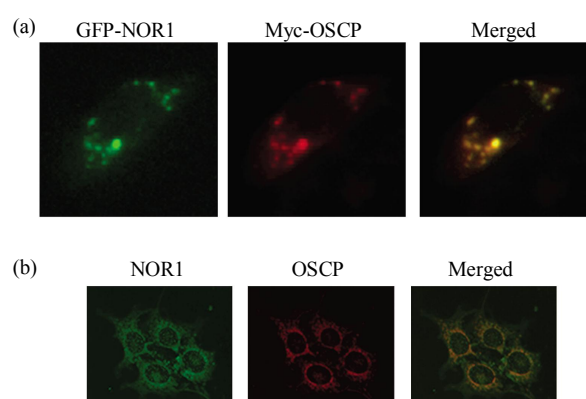


Fig. 5 Co-localization of NOR1 with OSCP in cells

(a) Co-localization of exogenously expressed GFP-NOR1 and Myc-OSCP in HeLa cells. (b) Co-localization of endogenous NOR1 with OSCP in NP69 cells. Green shows the location of NOR1 protetin expression. Red shows the location of OSCP protein expression. Yellow indicates merged location of NOR1 protetin and OSCP protein.

NOR1 与 OSCP 蛋白在细胞内存在交互作用. 为了进一步证实 NOR1 与 OSCP 之间的交互作用是发生在线粒体内, 将 5-8F 细胞瞬时转染 pCMV-myc-NOR1 质粒, 首先通过密度梯度离心法分离纯化线粒体, 用 1% 麦芽糖苷 /PBS 温和裂解线粒体, 抽提得到线粒体蛋白, 用 anti-OSCP 单克隆抗体进行免疫沉淀, 采用 c-myc 抗体在沉淀中检测到 myc-NOR1, 而用正常小鼠 IgG 沉淀转染 pCMV-myc-NOR1 的线粒体裂解物则不能产生免疫共沉淀(图 6). 在免疫共沉淀分析中, 有两点至关重要, 首先, 必须采用分离纯化后的线粒体, 而不是提取细胞总蛋白来进行免疫沉淀, 因此, 免疫沉淀下来的才是线粒体中的 OSCP 与 NOR1 蛋白, 证明两者的交互作用是发生在线粒体中. 其次, 必须采用 1% 麦芽糖苷 /PBS 温和裂解线粒体, 该步骤可以有效分离线粒体膜复合物但不引起复合物解离^[7]. 以上结果证明, NOR1 蛋白与 OSCP 蛋白在

线粒体内存在直接交互作用,提示 NOR1 基因可能参与细胞能量代谢.线粒体 ATP 合成酶(F_0/F_1 -ATPase, ATP synthase)又称为氧化呼吸链复合物 v ,主要定位于线粒体内膜,是氧化与磷酸化的偶联装置,在能量代谢中扮演着至关重要的角色. F_0/F_1 -ATPase 表达水平下降、活性降低是肿瘤细胞能量代谢紊乱的因素之一^[8~10].在人类肝癌细胞中, F_0/F_1 -ATPase 活性下降了 50%~70%^[11].另外, F_0/F_1 -ATPase 活性下降也是结肠癌细胞对 5-Fu 耐药的原因^[12].OSCP 是 ATP synthase 一个重要的亚基和调控因子^[13~15],因能介导寡霉素抑制氧化磷酸化而得名.敲除 OSCP 基因导致酵母细胞 F_0/F_1 -ATPase 活性丧失,在正常生长条件下难以存活^[16].NOR1 有可能通过 OSCP 与 F_0/F_1 -ATPase 相结合,并对其酶活性产生调节作用.鼻咽癌组织及细胞系 NOR1 基因表达下调甚至缺失,有可能损伤 F_0/F_1 -ATPase 活性,引起鼻咽癌细胞能量代谢紊乱.

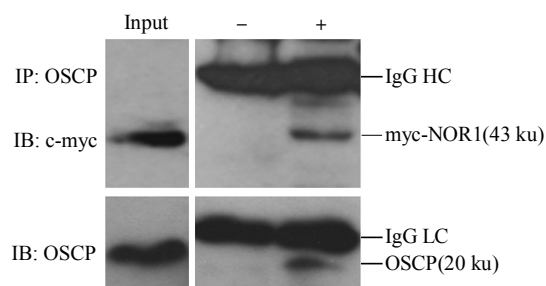


Fig. 6 Interaction between NOR1 and OSCP in mitochondrion revealed by co-immunoprecipitation

Lysate of mitochondrion isolated from 5-8F cells transfected with pCMV-myc-NOR1 were immunoprecipitated using mouse anti-OSCP antibody or normal mouse IgG as negative control. The precipitated proteins were subjected to immunoblot with mouse anti-c-myc or anti-OSCP primary antibody. Myc-NOR1 protein co-immunoprecipitated with OSCP protein. IgG HC and IgG LC represent mouse IgG heavy and light chain, respectively.

酵母双杂交筛选得到的其他 6 个候选交互作用蛋白中, MT2A、BPY2IP1、CPE 以及 CRIM2 都是胞浆蛋白,鉴于 NOR1 蛋白部分表达于胞浆组分,因此在空间结构上来说,胞浆组分中的 NOR1 存在与这些蛋白质发生交互作用的机会,从而参与这些蛋白质所涉及的生物学功能. ICAM5 是特异表达于神经元细胞膜上的跨膜糖蛋白,该蛋白质胞外段有 9 个免疫球蛋白结构域,共 832 个氨基酸,跨膜区 28 个氨基酸,胞内段为 64 个氨基酸^[17].我

们通过酵母双杂交筛选得到的是 ICAM5 蛋白的 711~868 个氨基酸,包括一段胞外区、全部跨膜区和胞内段 8 个氨基酸残基.从空间结构来看,定位于胞浆的 NOR1 似乎难以与跨膜蛋白 ICAM5 在细胞内发生交互作用,如果存在交互作用,也只可能与其胞内段结合,但是我们筛选得到的片段仅包括 8 个胞内段氨基酸残基,仅凭现有的结果,尚难以认为 NOR1 可以通过这 8 个氨基酸残基与 ICAM5 结合.补体 C2 是经典补体途径的一个组分, C2 在细胞内合成后释放入血液系统,目前尚不清楚 NOR1 是否可以与细胞内 C2 交互作用.尽管双杂交系统已被证实为一种高敏感的蛋白质研究体系,但是这种方法不可避免也存在假阳性^[18].鉴于此, NOR1 与其他 6 个候选交互作用蛋白之间的关系需要通过进一步的实验来证实.

致谢 感谢第四军医大学微生物教研室张伟博士在酵母双杂交实验中的帮助.

参 考 文 献

- Ni e X, Zhang B, Li X, *et al.* Cloning, expression, and mutation analysis of NOR1, a novel human gene down-regulated in HNE1 nasopharyngeal carcinoma cell line. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003, **129**(7): 410~414
- 李桂源, 刘华英, 周 鸣, 等. 鼻咽癌癌变的分子机理. *生物化学与生物物理进展*, 2006, **33**(10): 922~931
Li G Y, Liu H Y, Zhou M, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33**(10): 922~931
- 熊 炜, 曾朝阳, 肖炳燧, 等. 一个新硝基还原酶基因 NOR1 编码区单核苷酸多态与鼻咽癌的关联分析. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30**(3): 401~405
Xiong W, Zeng Z Y, Xiao B Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30**(3): 401~405
- 聂新民, 桂 嵘, 李登清, 等. 新克隆的基因 NOR1 对鼻咽癌细胞株 HNE1 细胞生长的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32**(8): 777~780
Nie X M, Gui R, Li D Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32**(8): 777~780
- Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 1989, **340**(6230): 245~246
- Yang J, Liu X S, Bhalla K, *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 1997, **275**(5303): 1129~1132
- Schagger H. Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria. *Meth Cell Biol*, 2001, **65**: 231~244
- Cuezva J M, Krajewska M, de Heredia M L, *et al.* The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res*, 2002, **62**(22): 6674~6681
- Isidoro A, Martinez M, Fernandez P L, *et al.* Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast,

- gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J*, 2004, **378**(Pt1): 17~20
- 10 Cuezva J M, Chen G, Alonso A M, *et al.* The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis*, 2004, **25**(7): 1157~1163
 - 11 Capuano F, Varone D, D'Eri N, *et al.* Oxidative phosphorylation and F0F1 ATP synthase activity of human hepatocellular carcinoma. *Biochem Mol Biol Int*, 1996, **38**(5): 1013~1022
 - 12 Shin Y K, Yoo B C, Chang H J, *et al.* Down-regulation of mitochondrial F1F0-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance. *Cancer Res*, 2005, **65**(8): 3162~3170
 - 13 Zheng J, Ramirez V D. Purification and identification of an estrogen binding protein from rat brain: oligomycin sensitivity-conferring protein (OSCP), a subunit of mitochondrial F0F1-ATP synthase/ATPase. *J Steroid Biochem Mole Biol*, 1999, **68**(1~2): 65~75
 - 14 Zheng J, Ramirez V D. Rapid inhibition of rat brain mitochondrial proton F0F1-ATPase activity by estrogens: comparison with Naq, Kq-ATPase of porcine cortex. *Europ J Pharm*, 1999, **368**(1): 95~102
 - 15 Johnson K M, Chen X, Boitano A, *et al.* Identification and validation of the mitochondrial F₁F₀-ATPase as the molecular target of the immunomodulatory benzodiazepine Bz-423. *Chem Biol*, 2005, **12**(4): 485~496
 - 16 Prescott M, Bush N C, Nagley P, *et al.* Properties of yeast cells depleted of the OSCP subunit of mitochondrial ATP synthase by regulated expression of the ATP5 gene. *Biochem Mol Biol Int*, 1994, **34**(4): 789~799
 - 17 Annaert W G, Esselens C, Baert V, *et al.* Interaction with telencephalin and the amyloid precursor protein predicts a ring structure for presenilins. *Neuron*, 2001, **32**(4): 579~589
 - 18 Gietz R D, Triggs-Raine B, Robbins A, *et al.* Identification of proteins that interact with a protein of interest: applications of the yeast two-hybrid system. *Mol Cell Biochem*, 1997, **172**(1~2): 67~79

Screen and Identification of The Protein-protein Interactors of NOR1, a Novel Gene Down-regulated in Nasopharyngeal Carcinoma*

XIANG Bo^{1)**}, WANG Li^{1)**}, YI Mei^{2)**}, OUYANG Jue¹⁾, LI Xia-Yu¹⁾,
ZHANG Zu-Ping¹⁾, LI Xiao-Ling¹⁾, LI Gui-Yuan^{1)***}

⁽¹⁾Cancer research Institute of Central South University, Changsha 410078, China;

⁽²⁾Department of Dermatology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract NOR1 is a novel nasopharyngeal carcinoma(NPC) associated gene. It is significantly down-regulated in NPC cell line HNE1 and spontaneous NPC biopsies. Over-expression of NOR1 in HNE1 cell line is effective to inhibit HNE1 cell growth and proliferation. To establish a clearer picture of what the functions of NOR1 might be and to identify cellular proteins that might bind to NOR1, a yeast two-hybrid screen was performed to search for proteins that interact with NOR1. 10 positive clones which encoded for 7 polypeptides were successfully isolated. Among these 7 candidate interaction proteins, one candidate was mitochondria ATP synthase subunit OSCP. NPC cell line 5-8F cells were transfected with pCMV-myc-NOR1 plasmids, then the mitochondrial proteins and cytoplasmic protein were isolated by cellular subfraction and subjected to Western blot assay. The data showed that myc-NOR1 protein distributes in mitochondrion and cytoplasm. Immunofluorescence assay also showed the endogenous NOR1 protein co-localized with mitochondrion in human normal nasopharyngeal epithelial cells NP69, which indicate that NOR1 is a novel mitochondrial protein. The interaction between NOR1 and OSCP was confirmed by specific yeast two-hybrid assay, immunofluorescence co-localization and co-immunoprecipitation assay. These primary work suggests NOR1 may be involved in energy metabolism.

Key words NOR1 protein, yeast two-hybrid system, OSCP, protein-protein interaction

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00684

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2006cb910502), the 111 Project(111-2-12) and Hi-Tech Research and Development Program of China(2007AA02Z170).

**These authors contributed to this paper equally.

***Corresponding author. Tel: 86-731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

Received: October 7, 2008 Accepted: April 8, 2009