

核受体及其转录活化机制研究的新突破*

——辅活化子和辅阻遏子

穆小民 刘以训

(中国科学院动物研究所, 生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 核受体是一类配体依赖的转录因子, 它们之间有相似的结构, 在进化上来源于同一前体, 它们和基础转录因子有直接的联系, 与配体结合后, 作用于其目标基因的特定应答元件上, 从而活化特定基因的转录. 核受体介导的转录活化需要有辅活化子 (coactivator) 和辅阻遏子 (corepressor) 的参与, 这些辅活化子和辅阻遏子是有效的转录所必需的. 它们能和核受体特异结合, 并在核受体和基础转录因子之间发挥中介作用. 目前发现普遍存在并在转录过程中具有重要作用的辅活化子有 CBP/P300 和 SRC-1 等, 辅阻遏子有 SMRT 等.

关键词 核受体, 转录因子, 辅活化子, 辅阻遏子

学科分类号 Q756

核受体 (nuclear receptor) 是一类配体依赖的转录因子, 成员众多, 构成了一个大家族^[1]. 核受体包括类固醇受体 (steroid receptor), 甲状腺素受体 (thyroid receptor), 维甲酸受体 (retinoic acid receptor) 及视黄醇 X 受体 (retinoid X receptor) 和数目众多的孤儿受体 (orphan receptor)^[2]. 多年来, 人们认为类固醇激素受体的作用机制比较简单, 类固醇激素直接穿过细胞膜, 到达胞质和核膜, 活化核膜上的受体, 受体再和特定 DNA 上的应答元件 (response element, RE) 结合, 从而活化特定的转录过程^[3]. 经过近几年的大量研究, 现在已知情况并非如此, 类固醇受体只是一个大受体超家族的一组, 在这个超家族中, 配体并不一定是类固醇, 在一些情况下, 受体是未知的, 受体并不是在核膜上被动等待着配体活化, 有时没有配体也可活化, 受体之间可以聚合成同源聚合物 (homodimer), 或异源聚合物 (heterodimer), 共同发挥作用. 有时受体并不直接作用于 DNA 就起到调控转录的作用^[4]. 更有意思的是, 受体和一些辅调控蛋白 (coregulator) 作用, 这些辅调控蛋白在受体和基础转录因子 (basal transcription factor)

之间起着信号传导介质的作用. 这些辅调控蛋白是目前核受体研究的热点, 包括辅活化子 (coactivator) 和辅阻遏子 (corepressor) 两类, 它们在转录调控过程中起着极其重要的作用^[5].

1 核受体的特征及其进化

核受体在结构上有着共同的特征, 它的典型结构分为六个部分, 即 A、B、C、D、E 和 F 区, A/B 区在长度、序列和结构上高度多变, 该区含有一转录活化区, 称为 AF1, 其通过和基础转录因子, 辅活化子或其他转录因子的相互作用活化目标基因. C 区为 DNA 结合区 (DNA binding domain, DBD), 高度保守^[6]. 各种核受体的 DBD 有很高的同源性, 在结构上有两个锌指 (zinc finger), 分别称为 P 盒 (P-Box) 和 B (B-Box) 盒, D 区为一多变的绞链区, 允许核受体蛋白曲折或者改变构型, 通常含有一核定位区和一转录活化区. E 区相对较大 (约 250 个氨基酸), 并高度聚合, 其

* 国家自然科学基金国际合作和交流项目资助 (39660111050).

收稿日期: 1997-01-29, 修回日期: 1997-06-23

功能较复杂,核受体的激素结合区(hormone binding domain, HBD)在E区,此外,E区还具有和热休克蛋白结合、聚合、核定位、转录活化、分子内沉寂、分子间阻遏的作用.核受体的D区的转录活化区,称为AF2.一些核受体在C端还含有一段多变的F区,目前还没有发现F区的特定功能,缺失雌激素受体的F区并不影响雌激素受体的功能^[7].核受体是一类古老的受体家族,在植物、昆虫、两栖动物、棘皮动物都有代表存在,在进化上来源于同一前体^[8],目前的研究表明,孤儿受体为进化的始祖,类固醇、甲状腺和维生素D受体为该族中高度进化的成员^[9].核受体在DNA上的应答元件有三类,一类为AGAACA的半回文序列,属于这类的有雄激素受体(AR)、糖皮质激素受体(GR)、孕激素受体(PR)、盐皮质激素(MR)^[3,10].另一类为相隔一定距离的为AGGTCA的多重复序列,属于这类的有雌激素受体(ER)、甲状腺激素受体(T3R)、维甲酸受体(RAR)、视黄醇X受体(RXR)、维生素D3受体(VD3R)和众多的孤儿受体^[11,12],如RXR的应答元件为DR1,其序列为AGGTCA*AGGTCA.另一类为单一的半位点(half site)AGGTCA,前面有两个特异的侧翼核苷酸,如TR3的RE为AAAGGTCA,属于这类的有类固醇因子(SF1),TR3和T3R^[13].第四类比较复杂,总的来说为不同排列组合的AGGTCA半位点,属于这类的有T3R、COUP-TFS^[14].

2 基础转录因子及其与核受体的相互作用

RNA聚合酶II催化的转录反应首先需要TATA盒处组装转录起始复合体蛋白(multiple initiation complex protein),组装的第一步是转录因子TFII D结合在TATA盒上,TFII D本身是一个复合物,它由TATA盒结合蛋白(TBP)和10种以上的TBP相关因子(TAFS)组成,TFII B在TBP和RNA聚合酶II之间起桥梁作用^[7],它是继TFII D加入转录起始复合体的因子,它结合在TFII D和

RNA聚合酶上,类固醇激素受体超家族中的COUP-TF1和甲状腺素受体的激活作用主要通过TFII B.其他的基本转录因子还有TFII A至TFII J^[5].TFII F由两个亚单位构成,能在体外没有DNA和其他因子存在下与RNA聚合酶形成复合体,并以此形式加入转录起始复合体.TFII E在体内以两个亚基构成的四聚体存在,在起始复合体中可能通过TFII B而不直接与DNA结合,TFII E参与TFII H的磷酸激酶活性调节,并可使ATP酶的活性成倍增加.TFII H是多亚基的蛋白质复合体,具有ATP依赖的DNA解旋酶活性,能参与核苷酸剪切修复过程,并具有蛋白激酶和ATP酶活性,它在转录-修复的连接上具有重要性,HSV VP16和p53蛋白等都与TFII H直接结合并激活靶基因的转录.上述基础转录因子不同于影响转录的一般转录因子,基础转录因子是转录的公用因子,没有基础转录因子,基础转录就不能进行,它们是转录过程所必需的因子,直接参与转录过程.研究表明,核受体可以直接和上述基础转录因子作用,而不需要中间调控蛋白的参与.例如用酵母的双杂合系统(yeast two hybrid system)证实RXR的激素结合区(HBD)和TBP之间存在着特异性配体依赖性的相互作用,很明显,这种作用不需要任何因子结合到DNA.同样雌激素受体的转录活化区AF1在体外和TBP之间有相互作用^[2].核受体和基础转录因子相互作用的结果,一般认为是加速了转录起始复合体形成的速率,并对转录起始复合体起稳定作用^[7].

3 辅活化子和辅阻遏子

大量的研究表明,虽然基础转录因子是转录所必需的,但只有基础转录因子还不够,有效的转录需要有辅活化子(coactivator)和辅阻遏子(corepressor)的参与,这些辅活化子和辅阻遏子在转录调控中发挥着极其重要的作用,成为目前核受体研究的热点,辅活化子和辅阻遏子与基础转录因子的不同在于辅活化子

和辅阻遏子对于基础转录并不是必需的,但没有辅活化子的存在,则不能形成有效的转录,辅阻遏子则起到阻遏有效转录的作用.关于辅活化子和辅阻遏子参与转录调控的机制目前还不很清楚,但辅活化子和辅阻遏子与核受体及各种基础转录因子之间存在着复杂的相互作用,如雌激素受体至少和10种辅活化子和基础转录因子之间有相互作用,而且辅活化子和辅阻遏子和核受体的结合可受配体调控,它们的结合需要一个结构活化的激素结合区.已发现雌激素可稳定辅活化子 ERAP160 或 P160 和 RIP140 与雌激素受体的结合,而抗雌激素则有去稳定作用.辅活化子和辅阻遏子在体内含量有限,如辅活化子参与体内某些转录过程,则同时体内的另一些转录过程会因辅活化子不足而不能有效转录,所以一些辅活化子如 CBP/P300 具有整合体内各种信号的作用,也称为整合子 (integrator).此外,核受体可同时结合到辅活化子 CBP/P300 和 SRC-1,形成一个三元复合体后结合到 DNA,表明各种辅活化子可通过形成单一的 DNA 结合转录因子来共同调控特定基因的转录活化^[5].目前已发现的辅活化子和辅阻遏子种类很多,但有很多属于同一类型,普遍存在并在转录调控中有很强作用的主要有以下几种.

3.1 CBP/P300

CBP/P300 (the binding protein of CAMP response element), 是一种独特的在进化上非常保守的磷酸蛋白,分子质量巨大,由2400个氨基酸组成.关于 CBP/P300 在核受体介导的转录活化中发挥重要作用的实验证据主要有以下几个方面:

- a. 在测试的所有细胞系中,都有 CBP/P300 的存在.
- b. CBP/P300 可以和各种 DNA 结合因子作用,并可和各种基础转录因子作用^[5].
- c. CBP/P300 可以和各种核受体相互作用.
- d. 在报告基因 (reporter gene) 细胞转染实验中, CBP/P300 可增强核受体 (ER、GR、

PR 等) 介导的基因转录作用,增强幅度可达10倍^[15].

e. 将 CBP/P300 的抗体注射进细胞核,可完全阻断 AP-1 介导的信号传递和信号到核受体的传递^[16].

f. CBP/P300 对腺病毒 E1A 蛋白的作用:在正常机体内,干扰素 α (interferon α , IFN α) 可以活化基础转录因子 ISGF,从而启动细胞的抗病毒防御机制.腺病毒可产生一种叫 E1A 的蛋白,该蛋白可阻断 IFN α 的作用,从而使病毒大量复制.通过研究发现 E1A 的蛋白的阻断作用是通过 CBP/P300 进行的,ISGF 由 Stat1、Stat2 和 P48 三部分组成,CBP/P300 的结构分为 CH1、CH2 和 CH3 三部分,通过 CH1 区域和 Stat2 作用,E1A 蛋白可以和 CBP/P300 的 CH3 区域结合,使 CBP/P300 在转录过程中不能发挥作用^[17].外源性注入 CBP/P300,可去除 E1A 对 INF- α 的阻断作用^[18].

3.2 SRC-1

SRC-1 (steroid receptor coactivator 1) 是用酵母双杂合系统以人 PR 的 HBD 作为钓饵从人的 cDNA 文库中筛选出来的,其分子质量是 125 ku, SRC-1 的 mRNA 在测试的所有细胞中都存在, SRC-1 增强 GR, ER 和 TR 和 RXR 介导的体内转录,可增强转录水平 10 倍, SRC-1 和 CBP/P300 有协同作用^[19].

3.3 ARA70

ARA70 是一种 AR 依赖 (AR-associated) 的蛋白质,它是一种辅活化子 (coactivator),在 DU145 细胞,在 10^{-10} mol/L 二氢睾酮 (DHT) 或 10^{-9} mol/L 睾酮 (T) 的存在下,可使 AR 介导的转录活力增强 10 倍,在 DU145 细胞,ARA70 只轻度诱导类固醇激素受体如 ER、GR 和 PR 的转录^[20].

3.4 SMRT

SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor) 是一种目前研究最多的辅阻遏子,它是用酵母双杂合系统以未结合配体的人 RXR 的 HBD 融合蛋白为钓饵筛选出来

的,其表达广泛, SMRT 和结合有配体的 RXR、RAR 和 TR 的 HBD 有强烈的结合作用^[5]。

关于核受体介导的转录活化的机制,目前一般认为在非活化状态时,核受体和热休克蛋白结合,其聚合区处于分子内部而不能发挥聚合作用,所以核受体不能高亲和力地同 DNA 上的应答元件结合,当核受体和其配体结合或通过其他机制活化时,热休克蛋白解离,其构型发生变化,聚合区暴露,核受体聚合,这样就能高亲和力地同 DNA 上的应答元件结合,使得 DNA 的构型改变,易于在 TATA 盒处组装转录起始复合体^[7]。辅活化子和核受体结合后,使得其构型更易于和 DNA 上特定的应答元件结合,辅阻遏子则起到相反的作用。同时核受体和基础转录因子之间有着直接的相互作用,或者通过辅活化子和辅阻遏子和基础转录因子发生相互作用。总之,核受体介导的转录活化机制的研究是近一二年生物学研究的热点,很多世界一流的实验室都从事这方面的研究,目前已发现了多种转录活化过程中必需的辅活化子和辅阻遏子,这是该领域内取得的重大突破,一些著名的科学家已根据该突破提出了一些令人信服的转录活化的分子机制的模型。目前辅活化子和辅阻遏子的研究集中在它们和受体的作用部位,各种辅活化子和辅阻遏子之间的生理联系,以及它们和基础转录因子的作用方式、启动子等基因结构对这种作用的影响等方面,这些研究将会对最终揭示转录活化的机制奠定基础。

参 考 文 献

- 1 Uemura H, Mizokania, Chang C. Identification of a new enhancer in the promoter region of human TR3 orphan receptor gene. A member of steroid receptor superfamily. *J Biol Chem*, 1995, **270** (10): 5427~5433
- 2 Lee H J, Chang C. Identification of human TR2 orphan receptor response element in the transcriptional initiation site of the simian virus 40 major late promoter. *J Biol Chem*, 1995, **270** (10): 5334~5340
- 3 Umesono K, Evans R M. Determination of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptor. *Cell*, 1989, **57** (6): 1139~1146
- 4 Katzenellenbogen J A, O'Malley B W, Katzenellenbogen B S *et al.* Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormone. *Mol Endocrinol*, 1996, **10** (2): 119~131
- 5 Horwitz K B, Jackson T A, Bain D L *et al.* Nuclear receptor coactivator and corepressor. *Molecular Endocrinology*, 1996, **10** (10): 1167~1177
- 6 Fang C, Cooney A J, O'Malley B W. Cloning of a novel orphan receptor (GCNF) expressed during germ cell development. *Mol Endocrinol*, 1994, **8** (10): 1434~1444
- 7 Tsai M-J, O'Malley B W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem*, 1994, **63** (1): 451~486
- 8 Laudet V, Hanni C, Coll J *et al.* Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J*, 1992, **11** (3): 1003~1013
- 9 O'Malley B W, Connelly O M. Orphan receptor: in search of a unifying hypothesis for activation. *Molecular Endocrinology*, 1992, **6** (9): 1359~1361
- 10 Nordeen S K, Suh B J, Kuhnel B *et al.* Structural determination of a glucocorticoid receptor recognition element. *Mol Endocrinol*, 1990, **4** (12): 1866~1873
- 11 Yang Y Z, Subauste J S, Koenig R J. Retinoid X receptor α binds with highest affinity to an imperfect direct repeat response element. *Endocrinology*, 1995, **136** (7): 2896~2903
- 12 Glass C K. Differential recognition of target gene by nuclear receptor monomer, dimer, and heterodimers. *Endocr Rev*, 1994, **15** (4): 491~407
- 13 Wilson T E, Fahrner J J, Johnston M *et al.* Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science*, 1991, **252** (5010): 1296~1300
- 14 Cooney A J, Tsai S Y, O'Malley B W *et al.* Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (Coup-TF) dimers bind to different AGGTC A response elements allowing Coup-TF to repress hormonal induction of the vitamin D₃, thyroid hormone and retinoic acid receptor. *Mol Cell Biol*, 1995, **12** (9): 4153~4163
- 15 Smith C L, Dnate S A, Tsai M J *et al.* CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (17): 8884~8888
- 16 Kamei Y, Xu L, Heinzel T *et al.* A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptor. *Cell*, 1996, **85** (3): 403~414
- 17 Bhattacharya S, Eckner R, Grossman S *et al.* Cooperation of stat 2 and P300/CBP in signalling induced by interferon α . *Nature*, 1996, **383** (6598): 344~347
- 18 Chakravarti D, Lamorte V L, Nelson M C *et al.* Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature*, 1996, **383** (6595): 99~103
- 19 Janknecht R, Hunter T. A growing coactivator network. *Nature*, 1996, **383** (6595): 199~200
- 20 Yeh S Y, Chang C. Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (11): 5517~5521

New Progress in Nuclear Receptor and It Mediated Transactivation: Coactivator and Corepressor. MU Xiao-min, LIU Yi-xun (*State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*).

Abstract Nuclear receptor belong to a super-family of protein. Members of this family are characterized by similar three major structure region including a highly conserved DNA binding domain. Nuclear receptor bind to specific DNA

sequence and control specific gene transcription. Recent data show that, in addition to contacting to basal transcription factors, nuclear receptor inhibit or enhance transcription by recruiting the array of coactivator or corepressor. Coactivators are necessary for the efficient transcription. CBP/P300, SRC-1 and SMRT are the main coactivators and corepressor found so far.

Key words nuclear receptor, transcription factor, coactivator, corepressor

生长激素分泌促进剂及构效关系研究进展

刘亮 来鲁华 李崇熙¹⁾

(北京大学化学和分子工程学院, 北京 100871)

摘要 生长激素分泌促进剂是一类作用于垂体和下丘脑的具有专一性促生长激素释放作用的寡肽及其类似物。由于其分子质量小、活性高、可口服、作用专一而有可能成为新的生长激素治疗药物。目前已经发展了很多具有此类活性的多种结构的化合物, 如肽、环肽、肽醇及非肽类似物等。尽管这类化合物的作用机制尚未完全明确, 但已有证据表明存在新的调节生长激素分泌的途径和新的调节因子。

关键词 生长激素, 促生长激素释放肽, 生长激素分泌促进剂

学科分类号 Q575

生长激素 (GH) 是脑垂体前叶细胞分泌的蛋白质激素, 主要被两个下丘脑分泌的肽类激素调控: 生长激素释放因子 (GHRF) 诱导 GH 释放, 而生长激素抑制因子 (SRIF) 抑制 GH 释放。生长激素在临床上用于治疗各种 GH 缺乏症、骨质疏松、T 细胞缺乏症等^[1]。此外, 还有希望成为抗衰老药物。生长激素治疗主要通过静脉或皮下注射基因重组的人类的生长激素 (rhGH) 来进行。rhGH 使用很不方便, 还可能导致一些副作用, 如免疫反应等; 而且价格昂贵, 每个病人年平均花费需 20 000 ~ 30 000 美元。因此人们希望找到具有专一的促 GH 分泌活性, 可以口服, 易于合成的小

分子化合物。这些化合物可以提高内源性 GH 水平, 避免了外源性生长激素的使用, 价格上也有很大优势。

促生长激素释放肽 (GHRP) 是 70 年代末由 Momany 和 Bowers 等^[2~4]偶然发现的一类具有专一促 GH 分泌活性的脑啡肽类似物。通过大量的结构改造工作, GHRP 的活性已有很大提高, 但口服活性不理想。为提高口服活性, 环肽和非肽类似物成为近年来研究的热点。GHRP 及其非肽类似物被统称为生长激素分泌促进剂 (growth hormone secretagogues)。

¹⁾通讯联系人。

收稿日期: 1997-02-04, 修回日期: 1997-07-11