

综述与专论

Ras 的结构和功能及其参与的信号传导

熊舜斌 唐朝宇* 许根俊

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 从 ras 基因发现以来, 因为它和癌症的相关性, 引起了人们对其基因和蛋白研究的普遍关注. 通过这些研究不仅知道了 ras 基因的癌变作用机制, 而且对 Ras 蛋白与磷酸化途径的关系有了一个比较清晰的了解. 同时关于 Ras 蛋白所参与的信号传导途径的研究使得对细胞内的整个信息通路的开关和调节有了更进一步的认识. Ras 蛋白参与的信号传导途径还和其他的通路有相关性, 如 G 蛋白的 β 、 γ 亚基二聚体可以激活 Ras 途径. 因此对 Ras 途径的研究不仅可以了解 Ras 自身的调节途径, 而且对细胞内整体的信息传导的研究是十分必要的.

关键词 ras 基因, Ras 蛋白, 表达调控, 结构, 功能, 信号传导途径

1 ras 基因及其和癌变关系的发现

ras 基因即 Rat sarcoma 基因的缩写. 它首先在 Harrey 鼠肉瘤病毒 (Ha-MSV) 和 Kirten 鼠肉瘤病毒 (Ki-MSV) 的子代基因中被发现, 在这种子代病毒之中发现含有来源于宿主细胞的基因组^[1]的新基因序列, 此后人们将这种宿主细胞基因称为 ras 基因. 通过免疫反应发现感染了鼠肉瘤病毒的细胞中有一个由 ras 基因编码的分子量为 21 000 的蛋白, 并且这个蛋白在正常的细胞之中也被检测到.

经基因序列的比较确定了在哺乳动物之中类似于 Ha-MSV 和 Ki-MSV 基因序列的原癌基因. 与 Ha-MSV 和 Ki-MSV 基因相似的分别称为 Ha-ras-1 和 Ki-ras-2. 由于 mRNA 的剪接方式不同, Ki-ras 产生两种形式的 p21 蛋白, 分别为 Ki-ras-2A 和 Ki-ras-2B. 另一种相似的基因没有病毒类似物, 它是在神经母细胞瘤 (neuroblastoma) DNA 感染 NIH-3T3 细胞时发现的与 ras 类似的基因, 因而称为 N-ras^[2]. 除此以外, 在哺乳动物中还发现两个假基因, 即 Ha-ras-2 和 Ki-ras-1.

病毒的 ras 基因具有很强的使感染细胞发生癌变的能力. 病毒的 ras 基因和哺乳动物正常细胞中存在的 ras 基因相比较, 发生了某些关键点的突变, 从而导致了其编码的基因产物具有了癌变的能力, 对于来源于膀胱癌细胞株 EJ/T24 的 ras 基因序列分析表明癌变细胞的 Ha-ras-1 的一个碱基产生了突变^[3]. 这个突变发生在第 12 位氨基酸的密码上, 使正常的 Ras 蛋白的 Gly 突变为 Val. 这种细胞内被突变的 ras 基因还与人的许多种癌症有关. 除与癌症有关以外, 目前的研究结果表明正常的 ras 基因存在于包括酵母在内的所有真核生物之中, 它是许多生理功能的关键调节点. Ras 蛋白不仅参与细胞生长和分化调节, 同时也是多种信号传导途径的中介步骤.

2 ras 的基因结构及表达调控

不同种属来源的同一类 ras 基因的结构与功能有很强的保守性, 人的 ras 基因可补救酵母 ras 的缺失, 而酵母的致癌 ras 基因也可以转

温州医学院生物化学教研组, 温州 325000.

收稿日期: 1994-11-24, 修回日期: 1995-03-16

化小鼠成纤维细胞^[4]。在人和啮齿类中 Ha-ras、Ki-ras 和 N-ras 分布于三个不同的染色体上,各基因本身具有相同的内含子和外显子的排列方式,含有一个 5' 非编码外显子 (exon Φ) 和四个编码外显子 (exons 1~4)。ras 基因内含子大小和排列非常不同,因而整个基因也差异很大,如人 K-ras 有 35 kb 长,而 N-ras 为 3 kb。由于有两个第 4 号外显子, K-ras 可以两种方式剪接,但编码 K-ras-B 的 mRNA 含量高。除 K-ras-B 为 188 个氨基酸外,其他两种 Ras 蛋白均为 189 个氨基酸^[5]。

三个 ras 基因 5' 外显子上游均具有高 GC 含量而缺少 TATA 盒,通过对人和鼠的 H-ras 基因的分析了解到,外显子 Φ 5' 端的 40 bp 区看来是有几个转录起始位点,尽管在外显子 Φ 上游 175 bp 的保守区中有几个特征性的 GC 片段,而且这些序列中有一部分可以和核蛋白结合,但缺失突变的结果表明对表达几乎没有影响^[6]。在第一个内含子 5' 部分有一个约 235 bp 保守片段,缺失会降低表达量到 1/3~1/10,其他两个 ras 基因 K-ras 和 N-ras 也发现具有相似的情况,对 Ha-ras 的研究还发现除第一个内含子的 5' 端的调控片段以外还有两个片段也对表达调控有影响,一个是 3' 端的一系列重复序列 (tandem repeat sequence) 表现出微弱的增强子活力^[7]。另一个处于外显子 3 和外显子 4 之间的内含子中,有一个保守的替换外显子,这个 82 bp 外显子在人和啮齿类中可以编码 20 个氨基酸,加上前面的三个外显子可能编码一个 170 个氨基酸的产物。对成熟的转录产物进行分析发现含这个外显子的百分比很低,可能是这种剪切方式得到的 mRNA 稳定性差。将此 mRNA 的 cDNA 转染,细胞则不表现出生物活力,然而将此外显子剪接点突变掉,在细胞中 ras 基因将会得到 10 倍的全长 Ras 蛋白产物,因此这个外显子对 Ras 蛋白的表达水平和 mRNA 稳定性有很大的影响^[8]。

3 Ras 蛋白的结构及其与癌变的关系

和 G 蛋白 α 亚基相似, Ras 蛋白对鸟嘌呤

核苷酸具有高亲和性,并且定位于质膜的内表面,每摩尔的 Ras 蛋白结合 1 摩尔 GDP 或 GTP。Ras 蛋白 also 具有很强的保守性,和其他 GTP 结合蛋白相似, Ras 蛋白具有两种和鸟嘌呤核苷酸的结合形式,一种为 GTP 结合的活性形式,另一种为与 GDP 结合的非活性形式,通过两种形式的转换过程来调节细胞的生理功能并参与信号传导。GTP 结合形式直接作用于靶蛋白并传递信号, GDP 结合形式受到上游调节因子作用,并由此转化成为 GTP 结合的活性形式,从而启动 Ras 蛋白介导的信号传递途径,专一地和上游调节因子相互作用,根据上游的信号启动由 Ras 蛋白介导的传递途径,从而引起相应的细胞生长、发育等方面的变化。GTP 结合形式和 GDP 结合形式的转换是由 Ras 内源 GTPase 活性形式来完成,并受多种蛋白调节因子的作用。如果 Ras 蛋白 GTP 结合形式的半衰期增长,信号传递就将发生紊乱,进而影响细胞的正常生理活动,影响细胞的分化和发育,并可能导致致癌作用。影响 GTP 水解的因素有两个,一个是 ras 基因本身的突变,另一个则是调节 Ras 蛋白的因子发生了变化。

人的三种 Ras 蛋白 N 端 86 个残基相同,接下去 78 个残基有 79% 相同,除 186 位半胱氨酸外,它们最后 25 个残基差异很大,因而被习惯地称为差异区,此区序列缺失 166~179 段仍可维持 Ras 的功能,说明该区对于 Ras 蛋白功能并不重要^[9]。Ras 蛋白可结合 GTP、GDP、dGTP、ppGpp 和 GTP、GDP 的类似物,且结合序列是保守的,与结合有关的序列有: 10~17 位的 GXXGXGKS 与结合 α 和 β 磷酸有关, 57~60 位的 DXXG 中 Asp 结合 Mg^{2+} 离子而 Gly 主链在结合 GTP 时参与和 γ 磷酸形成氢键, 116~119 位的 NKXD, 参与结合鸟嘌呤环, 另外 144~146 位的残基也与结合有关。

Ras 蛋白仅具有很低的 GTPase 活性,不能达到生理条件下水解 GTP 失活 Ras 的速率,同时 GDP 的解离也相当缓慢,因此体内 Ras 蛋白的循环受到其他蛋白的调节,在细胞中分离得到有激活 Ras 的 GTPase 活力的蛋

白,称为 GAP (GTPase activating proteins),促进 Ras 蛋白和 GDP 解离的蛋白因子,称为 GDS (guanine nucleotide dissociation stimulators). 具有致癌作用的 Ras 蛋白与正常 Ras 比较,常常在 12 位、13 位、61 位和 63 位的氨基酸发生突变^[10],这些突变蛋白具有使内源 GTPase 活力降低的作用,同时更主要地是 GAP 的促进作用下降,从而使 GTP 结合的活性形式的半衰期延长 3~9 倍,由于这些突变并未影响 Ras 蛋白对鸟苷酸的结合,推测这些氨基酸的变化改变了 Ras 蛋白水解 GTP 的必要构象,同时 GAP 所起的稳定此构象的作用削弱,使水解速率降低. 人为的突变研究表明,位于鸟嘌呤核苷酸结合特征序列的突变如 116~119 位、144 位、146 位,削弱了和 GDP 的结合,使 GDP 的解离速率提高,由于细胞内 GTP 浓度远大于 GDP 浓度,结果使 GTP 的结合形式的浓度升高,此效果相当于加强 GDS 的作用. 研究还发现突变使 Ras 蛋白的生物活性丧失后,导入细胞内,内源 Ras 蛋白的功能会受到抑制^[11],其原因可能是由于竞争抑制上游激活因子的作用或者是参与调节因子的结合竞争.

由于 Ras 蛋白和癌变现象紧密相关,通过突变研究了解 Ras 蛋白的靶蛋白作用区定位于 32~40 位,即 X 射线衍射结果的 switch 1,该区的氨基酸序列是严格保守的,在不影响 GTP 结合和水解的情况下甚至 38 位的 Asp 突变为 Glu 也将完全丧失致癌 Ras 蛋白的致癌能力. 对致癌性和非致癌性 Ras 蛋白的晶体结构的比较还发现 switch 2 区即 59~75 位之间的区域可能也直接参与和靶蛋白的作用^[12].

Ras 蛋白 C 端具有较低的保守性,但对于 Ras 蛋白转化活力是必需的. 这是由于 Ras 蛋白的翻译后加工的法呢酰化 (farnesylation) 定位于 Cys186 的结果. Ras 蛋白首先在细胞质的游离核糖体中合成前体蛋白 (pro-p21),这个蛋白经过一系列的翻译后的 C 端修饰,增强了蛋白的疏水性使之定位于质膜的内表面,这种定位对于 Ras 功能来说是必需的. 如果引入其他的突变从而使蛋白游离于细胞质,那么会导致

活力丧失, Cys186 充当翻译后加工的起始,它首先为类异戊二烯法呢基化,然后 Cys186 之后的三个氨基酸被切除,再则 Cys186 羧基团被甲基化,这进一步增加了其对膜的疏水亲和力,最后在法呢基化的 Cys 上游的 Cys 残基被可逆棕榈酰化,进一步增加膜亲和力^[13]. 干扰细胞内 Ras 的法呢基化会导致 Ras 蛋白定位受阻,抑制其正常的作用,这使得由 Ras 突变引起的癌症可能可以通过抑制 Ras 蛋白的后加工而得到治疗.

4 参与调节 Ras 功能的蛋白因子

GAP 是首先发现于哺乳动物之中参与调节 Ras 活力的蛋白,分离出的 GAP 在体外可以显著地加速正常 Ras 蛋白的 GTPase 活力. 致癌性的突变如 12、13、59 或 61 位残基的突变使得 Ras 蛋白对 GAP 的作用有耐受性,虽然它们仍可与 GAP 结合,但是 GTPase 活性并不被促进. GAP 可以使 Ras 的体外 GTPase 活力提高 5 个数量级,这个功能区位于 GAP 蛋白的 C 端 1/3 处^[14]. GAP 对 GTP·Ras 有更强的结合,所有正常的 Ras 蛋白均对 GAP 的促水解作用敏感. 在 GAP 的 N 端区有两个 SH₂ (Src homology) 结构域处于另一个 SH₃ 结构域两侧,这个结构特点使得 GAP 可以和其他蛋白相互作用. 这暗示催化结构域起到促进 GTPase 活力的同时, GAP 其他部分可以参与和其他蛋白因子相互作用,例如 GAP 可与 PDGF 受体结合,因此 GAP 除参与调节 Ras 蛋白的 GTPase 活力以外还可能具有其他功能^[15].

从哺乳动物或其他低等真核生物中还分离出 NF1 基因编码的一个促进 Ras 的 GTPase 活性的 2818 氨基酸的蛋白,称为神经纤维瘤素 (neurofibromin),在蛋白靠中间的 350 氨基酸区域具有和 GAP 催化结构域相似的序列和功能. 大部分进行的实验取 NF1 蛋白的 GAP 相似区域,而非全长蛋白,它具有类似 GAP 的活性,对 Ras 亲和力高于 GAP,但激活 GTPase 活性的作用低于 GAP. 这种蛋白主要在神经系

统尤其是神经元中表达,神经纤维瘤素不是核蛋白,但是否和膜结合还不清楚. NF1 基因缺乏会导致神经纤维瘤,表明 NF1 在细胞中是必需的. 分析 NF1 病人的细胞株表明神经纤维瘤素在此细胞株中对 Ras · GTP 的调节是重要的,即使在细胞株中有正常水平的活性 GAP,但是缺乏神经纤维瘤素仍产生了高水平的 Ras · GTP,因此 NF1 基因充当的是一种肿瘤抑制基因,其调节 GTPase 活性的功能在此细胞株中是必需的,而且不能由 GAP 代替. 神经纤维瘤素的作用还和细胞株有关,成纤维细胞 GAP 的作用对于 Ras · GTP 的负调控已经足够^[16].

鸟苷酸交换因子(GDS)研究发现如果突变使 GDP 解离加快则会导致细胞被转化,说明 GDP 的交换速率是受到严格调控的. 最初发现参与调控 GDP 解离的蛋白是酵母 CDC25 和 SDC25 蛋白. 其中 CDC25 基因对于上游激活信号是必需的,它编码 1545 个氨基酸,是膜结合蛋白, C 端的三分之一为其活性区域. 而 SDC25 缺失不会导致 Ras 调控紊乱. SDC25 的 C 端具有和 CDC25 相似的结构,可以促进 Ras 蛋白 GDP 和 GTP 结合的交换. 其他种属的生物之中也发现了与 CDC25 及 SDC25 的 C 端功能区相似的 Ras 激活因子,如 *S. pombe* 中的 Ste 6 蛋白,在黑腹果蝇中的 Sos 蛋白. 在哺乳动物中也发现了类似功能的蛋白如 Sos 蛋白的类似物以及 Ras · GRF 蛋白^[17].

5 Ras 参与的调节途径

天然细胞中 GTP/GDP 结合形式的 Ras 水平可以被细胞外的刺激因子所改变,并且产生信号的传递. 现在已知的有 Ras 参与的信号传递途径大致有五种: a. 成纤维细胞的生长刺激和癌变; b. 造血细胞的增殖和分化; c. T 淋巴细胞的活化; d. 嗜铬细胞瘤细胞的似神经元分化; e. 上皮细胞的生长抑制. 这表明 Ras 在信号传递中充当了重要角色,但其如何将外源信号传递到细胞的适当位置,产生正确的反应, Ras 在其中又充当了什么样的角色,还不十分清楚. 但已有的实验证据表明 Ras 作为信号传

递途径中的一个环节充当了中介蛋白的作用,将多种上游信号集中加以调节. 目前的结果告诉我们受体蛋白的酪氨酸磷酸化可能作为 Ras 激活的上游信号,通过一些蛋白质之间的相互作用使 Ras 活化,然后再将信号传递下去. 例如表皮生长因子受体的胞外结构域在结合配基之后,受体形成两聚体形式,从而激活其酪氨酸激酶活力,并产生自身磷酸化. 这个自身磷酸化位点充当了信号传递中介蛋白 Grb₂ 中 SH₂ 结构域的高亲和力结合位点,由于细胞基质内 Grb₂ 蛋白通过其 SH₂ 结构域两侧的两个 SH₃ 结构域和 Sos 蛋白的脯氨酸丰富区(如鼠的 mSos 的 PPPVPPRR)结合形成复合物,因此受体和 Grb₂ 中 SH₂ 结构域结合之后使得 Sos 蛋白也处于细胞内膜的表面,导致 Ras 蛋白周围的 Sos 蛋白的局部浓度提高,促进 Ras · GDP 形式释放出 GDP 而结合 GTP,最终使 Ras 蛋白活化^[18]. Ras 参与的途径还可能通过受体偶联的 G 蛋白来启动^[19]. 当胞外信号通过受体传到 G 蛋白后,使 G 蛋白的 $\beta\gamma$ 亚基的二聚体和 α 亚基解离, $\beta\gamma$ 亚基二聚体和 Ras 蛋白调节因子如 Sos 和 Ras · GRF 上的 PH (pleckstrin homology) 结构域结合,这样也使得 Ras 结合的 GDP 被 GTP 交换, Ras 蛋白被活化. 这个途径可能只对应于一些特定的 G 蛋白. Ras 充当了酪氨酸激酶调节的信号传导途径的中介步骤,处于一个激酶级联反应的上游,依次包括 Raf、MAPKK (有丝分裂活化蛋白激酶) 和 MAPK. 这个级联反应的启动使信号从细胞表面通过适当途径传递到细胞内的靶蛋白,从而产生相应的细胞内反应.

在过去的研究中人们对 Ras 蛋白的结构和功能的关系进行了深入的研究,了解了 Ras 蛋白的功能必需残基及其致癌突变的位点. 对 Ras 蛋白参与的信号传导途径和活化机制也有了较深入的了解,但是由于细胞内错综复杂的相互作用,往往是一个通路和许多途径相互作用,在不同的细胞中, Ras 活化的途径可能有差异并且其对下游的影响也不同,这与细胞本身的生理调节相适应,却给研究带来困难. 因此

Ras 蛋白的研究还远远不够, Ras 的靶蛋白还没有最后确定, 虽然 Stokoe 等^[20]的最新研究表明 Raf 蛋白可能是 Ras 的靶蛋白, Raf 通过和 Ras 的作用被定位于质膜而活化, 从而启动了下游的磷酸化途径, 但对 Raf 如何与 Ras 形成复合物以及如何如何在膜上活化还不清楚, 另外现在所提出的 Ras 活化机制中没有概括 GAP 和 NF1 的作用, 它们如何和 mSos 相协调, 有待于了解.

参 考 文 献

- 1 Ellis R W, DeFeo D, Shih T Y *et al.* Nature, 1981; **292**: 506
- 2 Shimizu K, Goldfarb M, Shad Y *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1983; **80**: 2112
- 3 Krontiris T G, Cooper G M. Proc Natl Acad Sci USA, 1981; **78**: 1181
- 4 DeFeo-Jones D, Tatchell K, Robinson L C *et al.* Science, 1985; **228**: 179
- 5 Georg D L, Scott A F, Trusko S *et al.* EMBO J, 1985; **4**: 1199
- 6 Plumb M, Telliez J B, Fee F *et al.* Mol Carcinogen, 1991; **4**: 103
- 7 Spandidos D. FEBS Lett, 1987; **218**: 41
- 8 Cohen J B, Broz S D, Levinson A D. Cell, 1989; **58**: 461
- 9 Willumsen B M, Christensen A, Hubbert N L *et al.* Nature, 1984; **310**: 583
- 10 Barbacid M. Annu Rev Biochem, 1987; **56**: 779
- 11 Paul P, Frnak M J. Biol Chem, 1993; 9157
- 12 Milburn M V, Tong L, Devos A M *et al.* Science, 1990; **247**: 939
- 13 Gibbs J B. Cell, 1991; **65**: 1
- 14 Gideon P, John J, Frech M *et al.* Mol Cell Biol, 1992; **12**: 2050
- 15 Anderson D, Koch C A, Grog L *et al.* Science, 1990; **250**: 979
- 16 Zhang K, Papageorge A G, Martin P *et al.* Science, 1991; **254**: 1630
- 17 Shon C, Farnsworth C L, Neel B G *et al.* Nature, 1992; **358**: 351
- 18 Schlessinger J. TIBS, 1993; **18**: 273
- 19 Grespo P, Xu N Z, Simonds W F *et al.* Nature, 1994; **369**: 418
- 20 Stokoe D, Macdonald S G, Cadwallader K *et al.* Science, 1994; **264**: 1463

The Structure-Function Relationship and the Signal Transduction Pathway of Ras Protein.

Xiong Shunbin, Tang Chaoyu*, Xu Genjun (Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; * Department of Biochemistry, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China).

Abstract The ras gene has attracted great attention ever since it has been discovered having a relationship to cancer. Scientists not only know nowadays the mechanism about how ras gene results in cancer but also have a clear understanding about the relationship between Ras protein and the pathway of phosphorylation. In addition, the research about the signal transduction pathway which has something to do with the Ras protein leads to a more detailed understanding about the regulation of information communication in cells. Furthermore, the signal transduction pathways of Ras and of other proteins interact with each other. For example, the Ras pathway can be activated by the $\alpha\beta$ dimer of G protein. Therefore, it is extremely necessary to study the Ras pathway, which will throw great insight on the regulation of Ras itself and the signal transduction on the cell level.

Key words ras gene, Ras protein, expression regulation, structure, function, signal transduction pathway