

- 17 Quaife C J, Kelly E J, Masters B A, *et al.* Ectopic expression of metallothionein III causes pancreatic acinar cell necrosis in transgenic mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1998, **148** (1): 148~157
- 18 Sewell A K, Jensen L T, Erickson J C, *et al.* Bioactivity of metallothionein 3 correlates with its novel β domain sequence rather than metal binding properties. *Biochemistry*, 1995, **34** (14): 4740~4747
- 19 Williamson M P. The structure and function proline-rich regions in proteins. *Biochem J*, 1994, **297** (Pt2): 249~260
- 20 Uchida Y Ihara Y. The N-terminal portion of growth inhibitory factor is sufficient for biological activity. *J Biol Chem*, 1995, **270** (7): 3365~3369

Progress on Neuronal Growth Inhibitory Factor. JI Qing-Zhou, REN Hong-Wei, LI Ling-Yuan, RU Bing-Gen (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Life Science, Peking University National Laboratory of Protein Engineering, Beijing 100871, China*).

Abstract Neuronal growth inhibitory factor (GIF),

a brain-specific member of metallothionein family named metallothionein III (MT-III), is first validated to be capable of inhibiting the growth of neuronal cell in nervous system. GIF's amino acid sequence, structure and metal-binding properties are like other metallothioneins', and its gene shows strikingly high homology to other metallothionein-encoding genes, but they adopt different gene-regulation approaches. With its β -domain CPCP-loop, GIF may bind to some correlative factors that lie in brain extracts to display its specific physiological function. It is considered that GIF is markedly reduced in the brain of Alzheimer's disease (AD) patients and in several other neurodegenerative disease.

Key words neuronal growth inhibitory factor (GIF), metallothioneins (MTs), function, Alzheimer's disease

真核基因转录与转录调节相关复合物

徐海明 张 伸 刘德培 梁植权

(中国医学科学院基础医学研究所 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)
(中国协和医科大学基础医学院)

摘要 真核细胞核中转录因子与染色质模板如何相互作用调节基因转录是基因表达调控研究的一个中心问题。近来的研究表明, 参与基因转录的各种调节因子在核内形成多种复合物, 如 RNA 聚合酶 II 全酶、染色质重塑复合物、核小体以及增强小体等。这些复合物之间相互作用, 调节染色质结构, 在染色质模板上进一步组装成转录复合物, 参与转录调节的各个环节, 调节转录复合物活性。这些复合物的形成, 整合了转录调节的各种信息, 提高了转录调节效率, 是真核基因有效、严格、有序表达的基础。另一方面, 这些复合物的存在给基因表达调控的研究提出了新问题, 发展新的研究思路和新的研究技术具有重要意义。

关键词 基因表达调控, 转录复合物, 染色质

学科分类号 Q71

1 真核基因表达调节研究的几个基本问题

真核基因协调、有序的表达是真核生物完成正确的细胞分化与个体发育程序的前提。探索基因表达调控的基本规律, 是阐明生命本质的基础。转录水平的调节是基因表达过程中最重要、最复杂的环节。在真核细胞中, 转录因子如何调节染色质结构, 如何与染色质模板结合形成活性的转录复合物, 是基因转录机制研究的一个中心问题。真核生物中所有的转录调节因子都必须直接或间接通过三

种 RNA 聚合酶发挥作用, 但每一个基因的表达又各不相同, 那么这种多样性是如何统一在这三种 RNA 聚合酶基础上的呢? 基因是如何只在合适的组织细胞、合适的时间表达合适量的产物? 又是如何通过这因子感受内外环境信息、协调基因间的表达行为, 完成个体发育和细胞分化的程序? 这些都是真核基因表达调节研究必须解答的几个基本问题。

Tel: (010) 65296415, E-mail: liudp@public.east.cn.net

收稿日期: 1999-09-29, 修回日期: 2000-03-13

2 复合物的形成是基因有效转录的基础

体外研究发现, RNA 聚合酶 II 和通用转录因子需按一定次序结合在裸露的启动子 DNA 上, 形成转录起始前复合物 (preinitiation complex), 产生基础水平的转录. 结合于增强子上的一些活化蛋白可增强转录水平, 并且需要某些不与 DNA 直接结合的辅因子的存在. 越来越多的研究发现, 大多数活化蛋白可直接或通过辅因子间接与通用转录因子和 RNA 聚合酶 II 结合, 这种结合是活化蛋白发挥作用所必需. Goodrich 等^[1]提出如下三种模型来解释活化蛋白增强基因转录的机制: a. 活化蛋白直接或通过辅因子的作用募集通用转录因子和 RNA 聚合酶 II; b. 通过化学修饰作用调节通用转录因子和 RNA 聚合酶 II 的活性; c. 通过因子间结合产生的变构作用等机制, 促进转录起始复合物在启动子上组装, 调节转录起始复合物的活性, 从而增强基因的转录.

Koleske 和 Young^[2]的研究发现, 在酵母全细胞提取物中, SRB 蛋白、RNA 聚合酶 II 以及其他一些转录因子能被等摩尔共纯化, 具有基因转录活性, GAL4-VP16 可促进其转录. 随后有人从哺乳动物细胞核提取物中也纯化了类似复合物, 含有产生启动子特异转录所必需的各种成分^[3], 提示在细胞内 RNA 聚合酶 II 以及各种通用转录因子可形成类似原核生物 RNA 聚合酶全酶 (holoenzyme) 的复合物, 不必在 DNA 模板上一步一步组装. Hengartner 等^[4]克隆了 *srb* 基因, 并发现几种 SRB 蛋白在体内也可形成稳定的复合物. 这些 SRB 蛋白既能与 RNA 聚合酶 II 直接作用, 也能与活化蛋白结合, 是活化蛋白发挥作用的中介, 被称为中介体 (mediator). 最近, Asturias 等^[5]应用透射电镜观察到了纯化的中介体的微观结构及其与 RNA 聚合酶 II 间的相互作用, 证实了真核生物中 RNA 聚合酶 II 全酶的存在.

核小体以及染色质结构的形成是真核生物的一大特点. 在体外, 核小体能完全抑制基础水平的转录. 对酵母细胞组蛋白进行突变分析, 发现组蛋白突变后许多原先不表达的基因也开始转录, 提示组蛋白对基因表达具有很强的抑制作用. 近来研究发现, 一些活化蛋白具有乙酰基转移酶活性, 可对核小体进行化学修饰, 这种修饰是其发挥转录增强功能所必需. 于是人们提出另一些模型解释转录调节机制, 认为基因活化的主要机制是活化蛋白能通过

调节核小体结构解除其抑制作用, 暴露 DNA 上的顺式作用元件, 从而促进通用转录因子结合于启动子上组装成转录起始复合物, 增强基因的转录.

最近几年的研究发现, 在细胞内, 存在多种预先组装好的蛋白质复合物, 参与染色质结构的调节. 一些蛋白质复合物能抑制基因的表达, 如 SIR3/SIR4、PCG^[6]. 另一些蛋白质复合物被称为染色质重塑复合物 (chromatin remodeling complex), 如 SWI/SNF、RSC、NURF、CHRAC、ACF、FACT、SAGA、E-RC1 等^[7,8], 在 ATP 存在时, 能改变核小体的结构. Bazett-Jones 等^[9]利用纯化的 SWI/SNF 复合物, 观察到了该复合物可与核小体 DNA 非特异性结合并形成 DNA 环. 而 Lorch 等^[10]的研究提示, RSC 能将核小体从一个 DNA 分子转移到另一个 DNA 分子上, 因此这些复合可能通过增加核小体的流动性, 暴露 DNA 上结合位点, 进而促进转录起始复合物的组装. 最近的研究表明, 活化蛋白能募集 SWI/SNF 等复合物结合于转录调节区, 促进染色质结构的开放, 这些复合物的持续存在是基因持续活化所必需^[11]. 类似地, 阻遏蛋白也可募集 SIR3/SIR4 等复合物结合于 DNA 上, 促进致密染色质结构的形成, 抑制特定基因的表达.

每一个基因的调控区均有多个转录调节因子结合, 这些因子之间的作用有些是相加的, 更多的则是协同作用. 体内突变分析显示, 一个 TAF II 因子可同时与多个活化蛋白结合, 一个活化蛋白也可与多个 TAF II 因子作用. 在珠蛋白基因转录调节研究中, SP1、GATA-1、MAF 等因子都具有多价结合特性^[12]. Giese 等^[13]在 IFN β 、TCR α 基因增强子研究中, 发现结合的各转录因子间具有协同作用, 并且 DNA 上各因子结合位点的相对位置对这种协同作用具有非常明显的影响, 提示各因子间存在密切的相互作用, 这些因子间形成了高级结构, 从而作为一个整体复合物起作用, 称之为增强小体 (enhanceosome). 在人 β 珠蛋白基因簇中, 5' 端的 4 个高敏位点为各珠蛋白基因的高效表达所必需, 各高敏位点之间存在高度的协同作用, 组成位点控制区 (locus control region, LCR). 在各高敏位点内部, 也可分成功能不同的调节亚区. LCR 的完整性是 LCR 具有完整活性所必需, 因此 Grosfeld 等^[14]推测 LCR 与反式作用因子形成完全复合物 (holocomplex), 并以谐振 (flip-flop) 方式与各基因启动子复合物发生作用.

隔离子 (insulator) 的发现使人们对染色质结构和基因表达调节有了新的认识. 这方面的研究提示, 染色质结构可能分成不同的染色质功能区 (chromatin domain), 各功能区形成独立的表达调节单元, 处于同一区内的基因受共同的染色质环境调节, LCR、核基质附着区和隔离子是其中三大基本要素. Gerasimova 等^[15]对 Pc-G、TRX 蛋白进行研究后提出, Pc-G 和 Trx 蛋白在细胞核内不同部位形成复合物, 在此基础上, Mod/Su 蛋白与它们进一步结合, 形成隔离子复合物, 将核内染色质分成相对独立的调节区域, 在核内具有特定的分布. 最近, Cook^[16]根据转录复合物与 DNA 模板间的相对运动及其他一些证据, 更进一步提出一种模型, 认为细胞核内存在一种类似核仁的工厂, 参与转录、转录后加工、DNA 复制和修复的一些因子聚集于此形成相对固定的结构, DNA 分子则可在这些工厂中滑行进行转录和复制. 不过, 这些模型的真实性的尚待进一步验证.

由上可见, 在细胞核内, 基因的转录需要多因子参与, 这些转录因子在核内形成多种复合物, 各复合物之间相互作用, 调节染色质结构, 在染色质模板上进行组装, 形成并调节转录复合物的活性. 显然, 这些复合物的预先形成, 获得了比单个转录因子更强大的新功能, 极大地提高了转录调节的信息整合能力, 提高了转录调节的效率, 是真核基因有效、严格、有序表达的基础.

3 转录复合物研究需要解决的几个重要问题

一个基因往往含有多个顺式作用元件并与多种反式作用因子以及转录调节相关复合物结合. 那么, 它们在体内按怎样的次序结合并组装形成活性转录复合物的呢? 这是转录调节研究需要解决的一个重要问题. 通过对 DNA 高敏位点的分析, 人们发现, 染色质结构的开放是基因转录的一个基本前提, 但不是充分条件. 显然, 在染色质模板上, 转录调节因子是按一定次序逐步组装成有活性的转录起始复合物的. 最近, Cosma 等^[17]利用 CHIP (chromatin immunoprecipitation) 方法研究酵母活细胞中 HO 核酸内切酶基因表达过程中启动子上转录因子结合的次序, 发现 Swi5p 因子最先结合于染色质模板, 该因子能募集 SWI/SNF 复合物至启动子上促进核小体结构重塑, 并促进 SAGA 复合物结合, 使组蛋白乙酰化, 染色质结构进一步开放, 之后 Swi5p 因子脱离, SBF 结合于启动子上, 并募

集 RNA 聚合酶全酶组装成转录起始复合物开始转录. 可见, 组装需要一个触发点, 作为组装中心, 如 Swi5p 所起的作用. 对于调节区域较大的染色质模板, 这种组装可能存在多个中心, 通过协同作用、正反馈机制促进大复合物迅速形成. 例如, 在 LCR 上, 几个高敏位点具有相对独立的活性, 彼此间也存在紧密的协同作用, 可能各高敏位点上各有一个组装中心.

在真核基因转录过程中, 各种复合物间能通过直接的相互作用, 形成更大的复合物. 例如, 各增强子元件上结合的调节蛋白通过相互作用形成增强小体后, 能募集 RNA 聚合酶 II 全酶等复合物, 组装成更大的转录复合物. 那么, 这些复合物是如何发生相互作用的? 它们间的接触界面有什么特点呢? 不同基因的作用模式有何异同?

转录复合物一旦形成, 是否就能稳定存在呢? Grosfeld^[14]在研究 LCR 时, 提出在任一时刻 LCR 整体复合物只与一个启动子作用, 但 LCR 与各基因启动子的结合是动态的, 以谐振方式发生作用, 这种作用的持续时间从 15 min 至 80 min 不等. 那么体内转录复合物的稳定性是如何维持的呢? 由于 DNA 与蛋白质、蛋白质与蛋白质作用的亲和力的差别, 在复合物组装过程中, 一些因子能牢固结合在复合物上, 只在细胞周期 S 期或有丝分裂期或被化学修饰后才能解离, 是复合物维持稳定性的重要保证, 对基因表达的影响较大, 另外, 这种稳定结合也为细胞周期过程中基因差异表达提供契机. 一些因子结合力很弱, 处在动态变化之中, 因此因子间的竞争、因子的浓度变化可以微调基因表达量, 它们可能是基因表达量微调的一个重要因素^[18].

生物体具有很强的代偿能力, 真核基因的转录也具有强大的代偿能力. 一些研究显示, 当基因某一调控位点被去除后, 基因的表达并不受影响, 而只有去除几个位点之后, 基因的表达才会受到严重损害. 那么, 转录复合物是如何发挥代偿机制的呢? 一种推测是, 这些复合物具有一定的可塑性, 当一些因子突变或缺失后, 复合物会发生重组, 维持原有活性^[19].

4 研究的策略

要揭示转录调节的机制, 一方面必须确定有哪些顺式作用元件和反式作用因子参与基因转录, 确定这些因子有哪些功能, 它们自身的表达和活性是如何调节的. 另一方面, 应确定这些 DNA 元件和

转录因子是如何发生相互作用的, 确定转录因子间作用的网络关系, 研究它们组装、调节转录复合物的机制。目前, 已发现了许多与基因表达调节有关的 DNA 顺式作用元件和核蛋白因子, 研究了它们对基因表达的影响。然而, 这些研究能否反映体内真实的作用呢? 这一直是困扰基因表达调节研究的难题。因此, 发展新研究技术和新的研究思路, 研究体内 DNA-蛋白质真实的相互作用, 确定哪些因素对基因表达起关键作用, 这些因素在体内按什么次序、什么机制组装、调节转录复合物, 是非常重要的。现已发展的转基因动物、基因敲除、CHIP、LM-PCR、免疫共沉淀、融合蛋白亲和纯化蛋白质复合物等技术, 能在一定程度上研究体内真实的作用机制。不过, 这些方法仍具有一定的局限性, 仍需要不断完善。

随着大量复合物被纯化、鉴定, 这些复合物的组装及作用机制的研究也就面临着新的挑战。目前, 这方面的研究尚处在复合物分离、成分鉴定阶段, 还没有形成系统的研究方法和思路。要取得突破性进展, 还有待新技术、新思路的出现。现阶段, 除了要鉴定复合物的组分外, 还应研究各成分间的相互作用, 获得复合物组装的各种线索。在体外进行复合物组装, 或从体内纯化这些复合物, 利用电子显微镜等生物物理学方法研究它们的结构, 分析它们组装的规律, 也是一种重要的研究方法。可以相信, 随着技术的发展, 人们不但可以看清转录复合物的结构, 确定转录调节的各个细节, 还可以根据获得的知识设计新的复合物, 改变基因表达模式, 造福人类。

参 考 文 献

- Goodrich J A, Cutler G, Tjian R. Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. *Cell*, 1996, **84** (6): 825~ 830
- Koleske A J, Young R A. An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature*, 1994, **368** (6470): 466~ 469
- Ossipow V, Tassan J P, Nigg E A, *et al.* A mammalian RNA polymerase II holoenzyme containing all components required for promoter-specific transcription initiation. *Cell*, 1995, **83** (1): 137~ 146
- Hengartner C J, Thompson C M, Zhang J, *et al.* Association of an activator with an RNA polymerase II holoenzyme. *Genes Dev*, 1995, **9** (8): 897~ 910
- Asturias F J, Jiang Y W, Myers L C, *et al.* Conserved structures of mediator and RNA polymerase II holoenzyme. *Science*, 1999, **283** (5404): 985~ 987
- Felsenfeld G. Chromatin unfolds. *Cell*, 1996, **86** (1): 13~ 19
- Tsukiyama T, Wu C. Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell*, 1995, **83** (6): 1011~ 1020
- Armstrong J A, Bieker J J, Emerson B M. A SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, ERIC1, is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLF *in vitro*. *Cell*, 1998, **95** (1): 93~ 104
- Bazett-Jones D P, Cote J, Landel C C, *et al.* The SWI/SNF complex creates loop domains in DNA and polynucleosome arrays and can disrupt DNA-histone contacts within these domains. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (2): 1470~ 1478
- Lorch Y, Zhang M, Kornberg R D. Histone octamer transfer by a chromatin remodeling complex. *Cell*, 1999, **96** (3): 389~ 392
- Sudarsanam P, Cao Y, Wu L, *et al.* The nucleosome remodeling complex, Snf/Swi, is required for the maintenance of transcription *in vivo* and is partially redundant with the histone acetyltransferase, gcn5. *EMBO J*, 1999, **18** (11): 3101~ 3106
- Igarashi K, Hoshino H, Muto A, *et al.* Multivalent DNA binding complex generated by small Maf and Bach1 as a possible biochemical basis for beta-globin locus control region complex. *J Biol Chem*, 1998, **273** (19): 11783~ 11790
- Giese K, Kingsley C, Kirshner J R, *et al.* Assembly and function of a TCR alpha enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev*, 1995, **9** (8): 995~ 1008
- Wijgerde M, Grosveld F, Fraser P. Transcription complex stability and chromatin dynamics *in vivo*. *Nature*, 1995, **377** (6546): 209~ 213
- Gerasimova T I, Corces V G. Polycomb and trithorax group proteins mediate the function of a chromatin insulator. *Cell*, 1998, **92** (4): 511~ 521
- Cook P R. The organization of replication and transcription. *Science*, 1999, **284** (5421): 1790~ 1795
- Cosma M P, Tanaka T, Nasmyth K. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle and developmentally regulated promoter. *Cell*, 1999, **97** (3): 299~ 311
- Minie M E, Kimura T, Felsenfeld G. The developmental switch in embryonic β -globin expression is correlated with erythroid lineage-specific differences in transcription factor levels. *Development*, 1992, **115**: 1149~ 1164
- Zhang Q Y, Rombel I, Reddy G N, *et al.* Transcriptional regulation of human $\xi 2$ and α globin promoters by multiple nuclear factor-DNA complexes: the final act. In: Stamatoyannopoulos G. *Molecular Biology of Hemoglobin Switching*. United Kingdom: Intercept Limited, 1995. 193~ 202

Transcription of Eukaryotic Genes and Complexes Related to Transcription Regulation. XU Hai-Ming, ZHANG Shen, LIU De-Pei, LIANG Zhi-Quan (LIANG Chi-Chuan) (*National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union of Medical College, Beijing 100005, China*).

Abstract How transcription factors regulate gene transcription on chromatin is the central question of the study of gene expression regulation. Recent investigations showed that regulatory factors form

different complex in nucleus such as RNA polymerase II holoenzyme, chromatin remodeling complexes, nucleosome and enhanceosome, which participate each step of gene transcription and assemble into active transcription complex. Formation of these complexes integrates lots of information of transcription regulation and increase the efficiency of

transcription, which is the basis of orderly efficient expression of genes. On the other hand, it is a challenge to study these transcription complexes and development of new technology is important.

Key words gene expression regulation, transcription complex, chromatin

外源蛋白在中国仓鼠卵巢巢细胞中高效表达的策略*

刘国奇 王海涛¹⁾

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

摘要 高效表达外源蛋白, 在生物制药中有重要意义. 中国仓鼠卵巢巢细胞 (Chinese hamster ovary cell) 是表达外源蛋白的最佳真核表达系统之一. 影响外源蛋白在 CHO 细胞表达的因素甚多, 主要包括载体、宿主细胞和外源基因几方面. 深入了解和灵活运用它们之间的关系, 有助于获得外源基因在 CHO 细胞中的高效表达.

关键词 重组蛋白, CHO 细胞, 高效表达

学科分类号 Q78

中国仓鼠卵巢巢细胞 (Chinese hamster ovary cell, CHO 细胞) 是表达外源真核基因的最佳宿主之一. 但不同研究报道的外源蛋白表达水平差异较大. 本文阐述优化外源蛋白在 CHO 细胞中高效表达的策略.

1 CHO 细胞表达体系

目前, 广泛应用于生物制药的真核表达系统主要有酵母和 CHO 细胞. 常用的 CHO 细胞系有两种: CHO 和 CHO (DHFR⁻). 与其他表达系统相比, CHO 细胞具有如下优点: a. 外源蛋白容易在 CHO 细胞中合成并分泌到培养基中; b. 表达蛋白的折叠及二硫键的形成几乎与天然蛋白质相同; c. 在正常的氨基酸位置上发生糖基化; d. 能完成其他翻译后加工与修饰; e. 能正确组装多亚基蛋白; f. 外源基因的整合稳定; g. 能以悬浮培养或在无血清培养基中达到高密度, 且培养体积能达到 1 000 L 以上. 因此, CHO 细胞在生物制药业中受到广泛重视.

2 优化表达载体系统

2.1 影响外源蛋白在 CHO 细胞中的表达的因素

a. 转录效率; b. mRNA 的加工; c. mRNA 的

稳定性及翻译效率; d. 目的基因拷贝数; e. 外源蛋白翻译后的加工、分泌和稳定性. 针对上述因素, 在构建或选择 CHO 细胞表达载体时应考虑如下调控元件: a. 启动子和增强子 (P/E); b. 多聚腺苷酸加尾信号 (pA); c. 内含子 (INS); d. 选择标记, 如共扩增基因二氢乙酸还原酶 (DHFR) 和谷氨酰胺合成酶 (GS); e. 多克隆位点 (MCS); f. 原核复制起始区 (ori) 和抗性基因 (如 Ap) 组成的载体骨架, 以方便在 *E. coli* 中基因克隆. 真核调控元件是 CHO 细胞表达载体的重点, 图 1 是哺乳动物细胞表达载体的模式图.

ori	P/E	INS	MCS	pA	P/E	DHFR	pA	AP
-----	-----	-----	-----	----	-----	------	----	----

图 1 CHO 细胞表达载体的模式图

2.2 选择强启动子

强启动子/增强子是获得高表达的第一步. 目前商业化的表达载体中主要使用三种启动子. SV40 启动子是非洲猿猴病毒的启动子, 是最早用

* 国家“863”计划资助: Z18-01.

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (010) 66948632, E-mail: wanght@public.bta.net.cn

收稿日期: 1999-10-09, 修回日期: 2000-03-06