

蛋白 4.1 基因家族的研究进展

胡晓燕* 周 严 袁建刚 强伯勤

(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)
协和医科大学基础医学院

摘要 近几年, 先后发现了三种与红细胞中的 4.1 蛋白同源性很高的蛋白质, 这四种蛋白质都具有三个功能性结构域, 即膜结合结构域, 血影蛋白-肌动蛋白结合结构域和羧基端结构域. 而且除了已知的在细胞膜物理和生理特性维持方面的重要作用外, 4.1 蛋白还与有丝分裂以及神经突触的形成有关.

关键词 4.1R, 4.1G, 4.1N, 4.1B, 可变剪接

学科分类号 Q51

蛋白 4.1 (指红细胞膜蛋白经 SDS-PAGE 后第 4.1 条显色带) 是红细胞中以血影蛋白 (spectrin) 为基础的细胞膜骨架的一个基本成分, 在维持红细胞正常的形态和生物物理特性方面有重要作用. 蛋白 4.1 基因的缺失会导致红细胞畸形和溶血. 最近几年, 又相继发现了三种与红细胞中的蛋白 4.1 有很高同源性的蛋白质, 分别命名为 4.1G (广泛表达), 4.1N (神经元特异表达), 4.1B (主要在脑中表达), 而将红细胞中表达的蛋白 4.1 称为 4.1R, 这四种蛋白质的基因即构成了蛋白 4.1 基因家族.

1 4.1R

4.1R 是蛋白 4.1 家族中分离鉴定的第一个成员, 主要存在于红细胞中, 在其他非红细胞中也有表达. 在结构上, 4.1R 具有蛋白 4.1 家族所共有的三个结构域, 即位于氨基端的膜结合结构域 (MBD), 血影蛋白 (spectrin)-肌动蛋白 (actin) 结合结构域 (SABD) 以及较为保守的羧基端结构域 (CTD). 4.1R 通过膜结合结构域与膜蛋白 Glycophorin C 相互作用, 从而将细胞骨架限定到膜上. P55 (MAGUK (膜相关的鸟苷酸激酶) 超家族的成员)^[1] 也可与 4.1R 的膜结合结构域作用, 并通过它所带有的 PDZ 结构域与 glycophorin C 的羧基端作用, 使三者形成一个三元复合物, 对红细胞细胞膜的稳定以及红细胞内的信号传导有非常重要的作用 (图 1). 此外, 4.1R 与阴离子转运体带 3 蛋白 (band 3) 的结合减少了锚蛋白 (ankyrin) 和带 3 蛋白的相互作用, 从而对红细胞的机械特性也有一定调节作用. 虽然在多数非红细胞中不存在带 3 蛋白和 glycophorin C, 但非红细胞中的钙粘素和

CD44 等蛋白质同样也能与蛋白 4.1 细胞骨架成分相互作用^[2]. 近来研究表明, Ca^{2+} -钙调蛋白与膜结合结构域中特定的保守位点结合对 4.1R 与带 3 蛋白和 CD44 之间的亲和力有调节作用^[3]. 这些蛋白质与 4.1R 的相互作用过程不是静态的, 蛋白激酶 A、蛋白激酶 C 和酪蛋白激酶可催化 4.1R 发生磷酸化反应. 磷酸化的 4.1R 通过减少它与血影蛋白的结合^[4] 来促进血影蛋白和肌动蛋白的结合. 而且 4.1R 被蛋白激酶 C 磷酸化后, 将阻碍它与带 3 蛋白的结合, 从而抑制它与膜的结合. 4.1R 的 SABD 增强了血影蛋白和肌动蛋白的相互作用, 从而稳定了红细胞的细胞骨架. 4.1R 可利用两个不同的翻译起始位点编码两种不同大小的多肽, 一个是利用上游的 AUG 起始翻译, 得到一个 135 ku 的多肽, 另一个是利用下游的 AUG 起始, 得到 80 ku 的一个多肽. 在红细胞中 4.1R 主要以 80 ku 的形式存在. 而且 4.1R 通过可变剪接形成两种功能不同的 SAB 结构域, 一种是在红细胞中高表达且可与血影蛋白和肌动蛋白紧密结合的高亲和力异构体; 另一种主要在非红细胞和早期的红祖细胞中表达的异构体则缺少关键的 21 个氨基酸肽段^[5]. 在脑和其他非红细胞中表达的蛋白 4.1R 比红细胞中表达的 4.1R 异构体形式更为多样^[6], 对它们功能方面也了解得更少一些. 近来研究发现在非红细胞中, 某些 4.1R 异构体的 C 端结构域可与核有丝分裂器 (NuMA) 结合^[7], 推测可能与核骨架的建立

* 通讯联系人.

Tel: 010-65296411, E-mail: xiaoyanhu15@hotmail.com

收稿日期: 2000-05-22, 接受日期: 2000-07-07

和维持有关^[8]。除了蛋白 4.1 之外，编码带 3 蛋白、锚蛋白和血影蛋白及其在非红细胞类似物的基因家族也已经被鉴定^[9]。这些蛋白质异构体保留

了一些高度保守的可能具有重要功能的结构域，而一些同源性较小的区域则可能与蛋白质的亚细胞定位以及蛋白质相互作用有关。

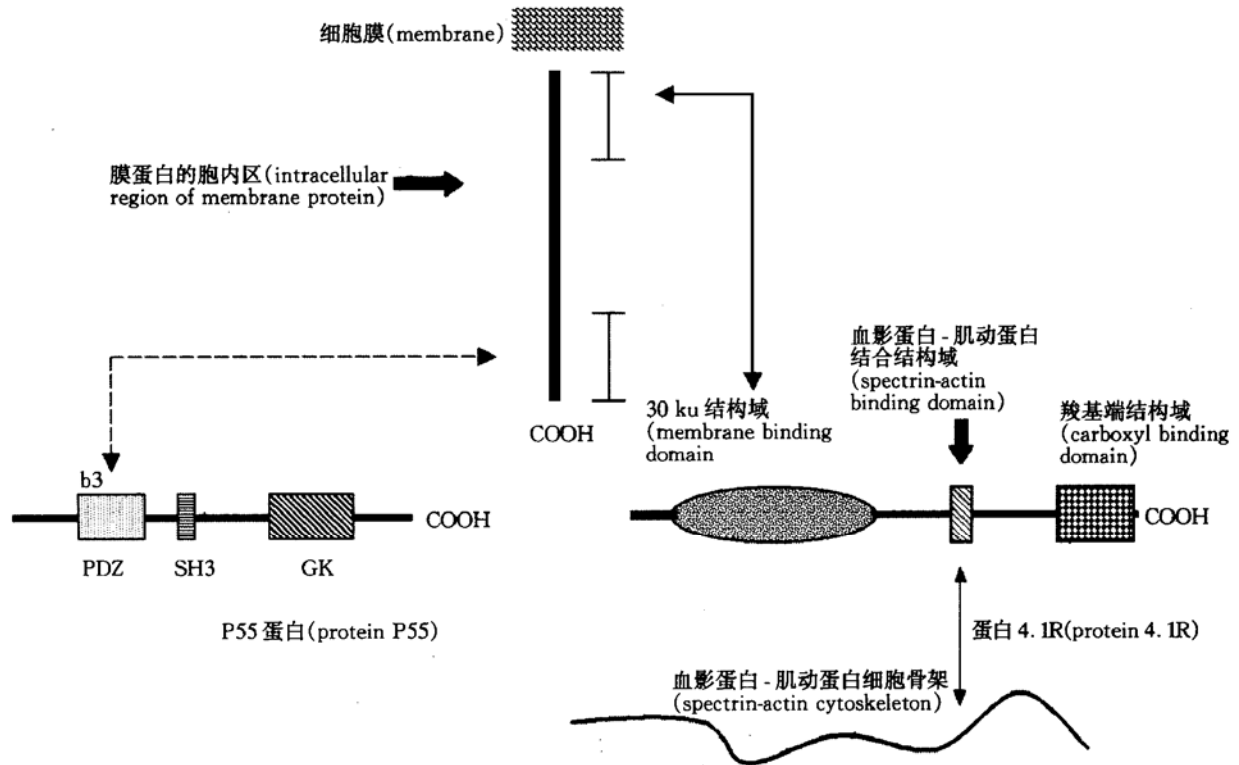


Fig. 1 interaction of protein 4.1 and other proteins of blood red cell

图 1 红细胞中 4.1 蛋白与其他蛋白质的相互作用示意图

2 4.1G

4.1G 是继 4.1R 之后发现的 4.1 基因家族的第二个成员。通过比较核苷酸序列、mRNA 大小、mRNA 的组织分布和染色体定位，确定 4.1G 和 4.1R 是由两个不同的基因编码的蛋白质^[10]。4.1G 基因位于人的六号染色体上，有一个 1005 个核苷酸组成的开放阅读框架，编码一 113 ku 的蛋白质。RNA 斑点杂交分析表明 4.1R 与 4.1G 都是广泛表达。蛋白 4.1G 和 4.1R 的序列比较表明，在膜结合区，二者有 76% 的同源性，而 4.1G 与带 3 蛋白的结合基序同 4.1B 一致，是 LEKDY，不同于 4.1R 的 LEEDY，这种由一个碱性氨基酸代替一个酸性氨基酸的变化，可能与功能上的差异有直接关系。另一个重要的功能性结构域——与血影蛋白-肌动蛋白结合的结构域也是高度保守的 (73% 一致性)。其羧基端结构域也高度保守，已证实这一区域和亲免疫素 FKBP13 (一种与免疫抑制药物 FK506 以及 rapamycin 有高亲和力的蛋白) 结合。

Walensky 等^[11]通过酵母双杂交，体外结合和免疫共沉淀等实验已经证实了 FKBP13 与 4.1G 的相互作用。4.1G 是第一个被发现的可与 FKBP13 结合的有生理活性的蛋白质。与 4.1R 比较发现，除了以上所列的相似性之外，4.1G 不同于 4.1R 的一个特点是 4.1G 只有一个翻译起始位点，这个位点与 4.1R 的第一个 AUG 相对应。

3 4.1N

与红细胞中的 4.1R 相似，4.1N 在神经元中可能也有多种与其他蛋白质的结合方式，包括神经细胞的膜骨架，整合膜离子通道，受体以及 MAGUK 家族成员。4.1N 在几乎所有的中枢和外周神经元中都有表达。人的 4.1N 基因存在于 20 号染色体上，而小鼠的 *m4.1N* 在 2 号染色体上。小鼠的 4.1N 蛋白和人的有 95% 的氨基酸同源性，而且小鼠的 4.1N 蛋白的三个保守结构域 MBD、SABD 和 CTD 与小鼠的 4.1R 蛋白的对应结构域分别有 70%、36% 和 46% 的一致性，与小鼠 4.1G

蛋白分别有 74%、37% 和 49% 的一致性。通过对小鼠 4.1G、4.1N 和 4.1R 蛋白的比较发现, MBD 区有很强的同源性。PCR 和蛋白质印迹分析表明, 4.1N 与 4.1R 一样, 也有多种剪接异构体。135 ku 的 4.1N 蛋白是 4.1N 在脑中主要存在的异构体形式, 而较小的 100 ku 的异构体则主要存在于外周组织中, 如肠道和肾的管状上皮的肠神经元中。肾是 4.1N 表达的主要的非神经部位, 因而可推测在神经元和肾上皮可能存在某种共同的骨架结构。4.1R、4.1G、4.1N 和 4.1B 均在脑中表达, 但 4.1R 只在一些特定的神经群体中表达, 4.1G 主要和胶质成分相关, 4.1N 在除了蒲肯野和多数丘脑神经元外的几乎所有神经元中都有表达, 而高水平的 4.1B mRNA 则定位于那些缺乏 4.1N 表达的神经元中。免疫组化研究发现同一细胞类型中特定骨架蛋白的不同类似物有不同的亚细胞定位。例如, 广泛表达的 β -血影蛋白在神经元的轴突和突触前末梢有表达, 而红细胞的 β -血影蛋白存在于神经元的胞体和树突上。在嗅球的僧帽细胞的核内发现了 4.1R, 而在僧帽细胞的胞体和树突中发现了 4.1N 的表达。可以假定, 膜骨架蛋白特定类似物的组合, 如 4.1, 血影蛋白和锚蛋白组装形成组织特异性和胞内细胞器特异性的骨架来完成细胞内的活动。通过免疫化学和间接免疫荧光的方法证实海马神经元中, 沿着树突, 4.1N 成簇分布。而且 4.1N 蛋白在不同神经元之间的突触连接区域含量丰富^[12], 推测其可能在突触的结构形成和功能方面起重要作用。此外, 4.1N 与突触的相关性通过 4.1N 与突触后膜蛋白 PSD95 及突触后兴奋递质 GluR1 的共定位得到了进一步的证实。NuMA 最初被鉴定为在有丝分裂时离开核并与纺锤体一极相结合的一种非组蛋白。研究表明 NuMA 在有丝分裂时有丝分裂器的组装和分裂末期核的重建过程中有重要作用^[13]。Ye 等^[14]已证实 4.1N 的 C 端结构域可与 NuMA 结合, 而且用 NGF 处理 PC12 细胞后会引发 4.1N 的入核并促进它与 NuMA 的结合。4.1N 入核后可使 PC12 细胞停止在 G1 期, 并形成畸形的细胞核。抑制 4.1N 入核可阻止 NGF 介导的细胞分裂停滞, 而 4.1N 的过量表达能逆转该过程。因此核 4.1N 可能通过拮抗 NuMA 在有丝分裂中的作用来介导 NGF 的抗增殖作用。

4 4.1B

4.1B 在脑中高表达, 并在其他许多组织中有

广泛表达。4.1B 定位于人的 18 号和小鼠的 17 号染色体^[15]。4.1B cDNA 的主要蛋白质产物是 103 ku。在结构方面, 它与 4.1G、4.1N 和 4.1R 非常相似, 包括三个与 4.1R 已知功能结构域有高度同源性的区域。其中最保守的序列是 4.1B 的 181~454 残基, 这一区域与 4.1R 的 MBD 有 74% 的一致性。然而, 4.1R 与带 3 蛋白结合的关键肽段是 LEEDY, 而 4.1B 是 LEKDY, 因此 4.1B 结合的目的膜蛋白与 4.1R 结合的目的蛋白可能不同。4.1B 的另一个保守结构域是 SAB 结构域。与 4.1R 相似, 通过可变剪接, 4.1B 能产生结构不同的 SAB 结构域: 脑中的 4.1B 异构体与 4.1R 的 SAB 结构域 C 端 43 个氨基酸有 50% 的一致性, 但缺少 N 端关键的 21 个氨基酸, 而在骨骼肌和心肌中表达的 4.1B 异构体有一个完整的功能性的 SAB 结构域。4.1B 的 C 端结构域组成了第三个保守结构域, 这一结构域不仅在其他哺乳动物的蛋白 4.1 中存在, 而且在相关的果蝇的蛋白 4.1 中也存在。4.1B 的这一结构域与 4.1R 的 NuMA 结合结构域和 4.1G 的 FKBP13 的结合结构域高度同源。4.1B 和 4.1R 在组成 NuMA 结合结构域的 C 端 59 个氨基酸残基中有大约 93% 的一致性。与之相似, 4.1B 和 4.1G 在对应 FKBP13 结合结构域的 C 端 92 个氨基酸残基中有 80% 的一致性。

除了这些保守的结构域以外, 蛋白 4.1B 也有几个一级结构与其他类型的蛋白 4.1 不同的独特结构。这些独特的结构域分别命名为 U1、U2 和 U3。U1 是指位于 4.1B 和其他蛋白 4.1 的膜蛋白结合结构域上游 N 端的前几个氨基酸 (headpiece)。在这一区域中, 除了起始端的 MTTE 肽之外, 4.1B 与其他的蛋白 4.1 几乎没有同源性。结构域 U2 对应的是膜结合结构域和 SAB 结构域之间的序列。同样, 这一结构域存在于所有蛋白 4.1 中, 但一级序列同源性很低, 功能也未知。U3 代表了蛋白 4.1 中另一个位置保守但一级序列不保守的结构域。这一区域的氨基酸组成与人的 440 ku 的锚蛋白异构体中大的插入片段有一些相似性。二者都富含谷氨酸和天门冬氨酸, 而且丝氨酸和苏氨酸的含量都很高。这一相似性的功能意义有待于进一步研究^[16]。

不同组织的 RNA 印迹^[17]表明脑中有 4.4 kb 的 4.1B mRNA 的高水平表达和 2.8 kb 的 4.1B 转录本的低水平表达。在胎盘中均有两种转录本, 在心、肺中主要表达大的转录本, 在胰腺和骨骼肌中

4.1B 也有低水平表达, 而在肝中则没有检测到 4.1B 的转录. 进一步的研究表明, 在脑的许多区域都有 4.1B 的高水平表达. 在大脑皮质中, 4.1B 在蒲肯野细胞中特异表达, 而 4.1R 和 4.1N 在颗粒层细胞表达, 在蒲肯野细胞中无表达. 在海马中也发现了同样的现象, 三种蛋白质有不同的表达模式. 4.1B 限于 CA1-3 的锥体细胞中, 4.1R 广泛地位于齿状回的颗粒细胞中, 4.1N 则在齿状回和 CA1-3 中都存在. 此外, 4.1B 在丘脑核中也有表达, 而其他三种蛋白 4.1 不表达. 在一些外周组织中如睾丸、肾上腺和胃肠道中也有 4.1B 的低水平表达. 更细致的研究发现, 除了在中枢神经系统中能检测到高水平的 4.1B 外, 在肠神经中 4.1B 也有转录. 对 4.1B 基因表达的调节也可通过前体 mRNA 的可变剪接介导. 组织特异的剪接事件似乎控制脑和心脏/骨骼肌中特异 4.1B 异构体的合成. 后一异构体包括 4.1R 基因的外显子 16 编码的血影蛋白-肌动蛋白结合结构域. 4.1B 异构体表现出许多与原型 4.1R 相同的特征. 保守结构域的存在表明蛋白 4.1B 在脑的特定神经元的骨架结构中的作用与 4.1R 在红细胞中的作用类似. 通过 RT-PCR 分析发现, 传统的红细胞类型的血影蛋白-肌动蛋白结合结构域仅仅在肌肉细胞中表达, 因为其他类型的细胞中不含外显子 16. 然而在脑中的这一区域中有一个 12 氨基酸的基序产生了一个修饰的结构域, 可与不同的神经元结合, 可能是非红细胞血影蛋白的脑特异的异构体.

综上所述, 蛋白 4.1 家族不仅通过与肌动蛋白、血影蛋白等家族的蛋白质以及细胞膜蛋白的胞质区相互作用, 维持细胞的正常形态和生理特性, 而且在细胞的有丝分裂和神经细胞中突触的形成过程中有重要作用. 此外可调控的可变剪接是蛋白 4.1 基因家族基因表达的一个基本特征, 而且这种可变剪接具有显著的组织特异性, 在肌肉、脑和上皮细胞中表达不同的 4.1R 蛋白异构体. 4.1 家族基因在不同的神经元中的区域-特异性表达表明, 脑中 4.1 家族成员的转录调节涉及多个区域调控元件的复杂过程. 因此以不同的蛋白 4.1 基因的上游调控序列为研究对象, 可能会发现一些新的调节元件, 对真核基因表达和调控的机制有更深入的了解. 每个蛋白 4.1 基因还编码与其他成员不同的独特的结构域, 这种不同与蛋白 4.1 的亚细胞定位有必然的联系, 但这些结构域的具体功能有待更深入的研究确定.

参 考 文 献

- 1 Marfatia S M, Cabral J H M, Kim A C, *et al.* The PDZ domain of human erythrocyte p55 mediates its binding to the cytoplasmic carboxyl terminus of glycophorin C: analysis of binding interface by *in vitro* mutagenesis. *J Biol Chem*, 1997, **272** (39): 24191~24197
- 2 Nunomura W, Takakuwa Y, Parra M, *et al.* Regulation of CD44-protein 4.1 interaction by Ca^{2+} and calmodulin. *J Biol Chem*, 1997b, **272** (48): 30322~30328
- 3 Nunomura W, Takakuwa Y, Parra M, *et al.* Identification of Ca^{2+} -dependent and independent calmodulin binding sites on protein 4.1: implications in regulation of 4.1 interactions with transmembrane proteins. *Mol Biol Cell [Suppl]*, 1997, **8**: 176a
- 4 Hu R J, Watanabe M, Bennett V. Characterization of human brain cDNA encoding the general isoform of beta-spectrin. *J Biol Chem*, 1992, **268** (5): 3758~3766
- 5 Tang T K, Qin Z, Leto T, *et al.* Heterogeneity of mRNA and protein products arising from the protein 4.1 gene in erythroid and nonerythroid tissues. *Cell Biol*, 1990, **110** (3): 617~624
- 6 Peters L L, Weier H U, Walensky L D, *et al.* Four paralogous protein 4.1 genes map to distinct chromosomes in mouse and human. *Genomics*, 1998, **54** (2): 348~350
- 7 Mattagajasingh S N, Huang S C, Hartenstein J S, *et al.* A nonerythroid isoform of protein 4.1R interacts with the nuclear mitotic apparatus (NuMA) protein. *J Cell Biol*, 1999, **145** (1): 29~43
- 8 Gascard P, Nunomura W, Lee G, *et al.* Deciphering the nuclear import pathway for the cytoskeleton red cell protein 4.1R. *Mol Biol Cell*, 1999, **10** (3): 783~798
- 9 Reiderer B M, Zagon I S, Goodman S R. Brain spectrin (240/235) and brain spectrin (240/235E): two distinct spectrin subtypes with different locations within mammalian neural cells. *J Cell Biol*, 1986, **102** (6): 2088~2096
- 10 Parra M, Gascard P, Walensky L D, *et al.* Cloning and characterization of 4.1G (EPB41L1), a new member of the skeletal protein 4.1 (EPB41) gene family. *Genomics*, 1998a, **49** (2): 298~306
- 11 Walensky L D, Gascard P, Fields M E, *et al.* The 13 ku FK506 binding protein FKBP13, interacts with a novel homologue of the erythrocyte membrane cytoskeletal protein 4.1. *J Cell Biol*, 1998a, **141** (1): 143~153
- 12 Garner C C, Kindler S, Zohar J, *et al.* Synaptic proteins and the assembly of synaptic junctions. *Trends Cell Biol*, 1996, **6**: 429~433
- 13 Krauss S W, Larabell C A, Lockett S, *et al.* Structural protein 4.1 in the nucleus of human cells: dynamic rearrangements during cell division. *J Cell Biol*, 1997, **137** (2): 275~289
- 14 Ye K Q, Duane A, Compton M, *et al.* Protein 4.1N binding to nuclear mitotic apparatus protein in PC12 cell, mediates the antiproliferative actions of nerve growth factor. *J Neurosci*, 1999, **19** (24): 10747~10756
- 15 Parra M, Walensky L D, Chan N, *et al.* Characterization of protein 4.1B, a novel member of the protein 4.1 family with high level, focal expression in brain. *Mol Biol Cell [Suppl]*, 1998b, **9** (11): 265a

- 16 Marilyn P, Philippe G, Loren D, *et al.* Molecular and functional characterization of protein 4.1B, a novel member of the protein 4.1 family with high level, focal expression in brain. *J Biol Chem*, 2000, **275** (5): 3247~ 3255
- 17 Goodman S R, Casoria L A, Coleman D B, *et al.* Identification and location of brain protein 4.1. *Science*, 1984, **224** (4655): 1433~ 1436

Research Progress in Protein 4.1 Gene Family

HU Xiao-Yan^{*}, ZHOU Yan, YUAN Jiar-Gang, QIANG Bo-Qin

(*Institute of Basic Medical Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, National Laboratory of Medical Molecular Biology, Beijing 100005, China*)

Abstract In recent years, three proteins that have high homology with protein 4.1 in red blood cell have been obtained. All of them involve three functional domains, membrane-binding domain, spectrin-actin binding domain and carboxyl terminal domain. Moreover, protein 4.1 is related to mitosis and the formation of the neural synapse besides that it plays an important role in maintaining the normal physical and physiological properties of the cell membrane.

Key words 4.1R, 4.1G, 4.1N, 4.1B, variable splicing

^{*} Corresponding author. Tel: 86-10-65296411, E-mail: xiaoyanhu15@hotmail.com

Received: May 22, 2000 Accepted: July 7, 2000