

核因子 κ B 的跨核膜转运及其调控机制*

沈利群^{1,2)} 徐祥¹⁾** 吕凤林¹⁾ 梁华平¹⁾

(¹⁾第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所, 重庆 400042; (²⁾中国人民解放军第 153 医院, 郑州 450042)

摘要 核因子 κ B (NF- κ B) 是一组重要的转录调节因子, 当细胞处于静息状态时, 它与抑制蛋白 I κ B 结合以非活性的形式存在于胞浆中. 当细胞受到多种外界信号刺激, NF- κ B、I κ B 分别在核定位信号 (NLS) 的介导下经核孔复合物 (NPC) 转运入核. 在核内, NF- κ B 与 I κ B 再次结合成复合物, 在核转出信号 (NES) 介导下, 经 CRM1 依赖的途径出核. 该过程是能量依赖的主动转运过程, 涉及小分子 Ran 蛋白及多种可溶性因子.

关键词 核因子 κ B (NF- κ B), 抑制蛋白 κ B (I κ B), 跨核膜转运, 核定位信号, 核转出信号

学科分类号 Q741, R365, R45

1 跨核膜转运过程简述

大分子物质在核与胞质间的转运由可溶性转运受体介导. 这些受体能通过核孔复合物 (nuclear pore complex, NPC) 在胞质和胞核间穿梭. NPC 是由大分子蛋白所组成的穿越核膜的亲水性通道^[1]. 转运受体结合到运载物分子上, 然后与 NPC 的纤丝相结合, 通过亲水性通道发生转位. 运载物分子含有核转入或核转出信号, 从而被转运受体识别, 这些信号分别称为核定位信号 (nuclear localization signal, NLS) 和核转出信号 (nuclear export signal, NES)^[2-4]. 研究表明, 核因子 κ B (NF- κ B) 含有经典碱性 NLS, p50 亚基中的 NLS 序列是 KRQK, p65 中的是 KRKR. 在抑制蛋白 κ B (I κ B α) 的第二锚蛋白重复区可能存在非经典 NLS^[5], 而 I κ B 家族的另一成员 BCL3 的氨基端含有 2 个经典碱性 NLS. NF- κ B 中并无 NES, 而在 I κ B α 的羧基端含有一个富含亮氨酸的 NES (C-NES), 但其功能目前还不清楚, 而位于其氨基端的 NES (N-NES) 对于 NF- κ B/I κ B 的核转出至关重要^[6,7].

大多数的转运受体是一个称为 importins 或 exportins 的保守的同源蛋白家族成员, 合称为亲核素 (karyopherins)^[2-4]. 每种亲核素在接头分子的作用下, 直接或间接地特异性识别一组 NLSs 或 NESs. 受体对运载物的结合和释放, 受其与 Ran 之间相互作用的限制. Ran 是一种 Ras 相关的 GTPase. Ran 与 GTP 或 GDP 相结合, 且这种结合状态受几种因子的调控. RanGDP 转换成 RanGTP 需要鸟苷酸交换因子 (guanine nucleotide exchange

factor, RanGEF, RCC1). RanGTPase 活化蛋白 1 (RanGTPase activating protein-1, RanGAP1, 在酵母内称 Ran1p) 可触发 Ran 对 GTP 的水解, 而且这种水解受 Ran 结合蛋白 1 和 2 (Ran-binding protein 1 和 2, RanBP1 和 RanBP2) 的协同刺激. RanBP1、RanBP2 和 RanGAP1 存在于胞质内, 而 RanGEF 在核内与染色质紧密结合. 因此, Ran 在胞质内以 GDP 结合的形式出现, 在核内以 GTP 结合的形式出现. 在胞质内缺乏 RanGTP 的情况下, importins 与运载物相结合转运入核后, 依赖与 RanGTP 的结合将运载物释放. 相反, 在核内存在 RanGTP 的情况下, exportins 与运载物相结合, 在胞质内依赖 Ran 结合的 GTP 水解将运载物释放. 随着运载物分子单一方向性转运的完成, 接头蛋白和受体必须通过 NPC 转运回胞质或胞核, 以便下一轮转运的发生^[2-4]. 目前, 对大分子生物跨核膜转运的研究重点, 已放在晶体结构及细胞生物学方面^[8].

2 NF- κ B/I κ B 的跨核膜转运

2.1 NF- κ B、I κ B 概况

NF- κ B 家族成员有 p50/p105 (NF- κ B1)、p52/p100 (NF- κ B2)、p65 (RelA)、cRel 和 RelB, 它们都有一段大约 300 个氨基酸序列的保守区, 称 Rel

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G1999054203), 国家自然科学基金资助项目 (30080009) 和重庆市科委基金项目 (2000-6319).

** 通讯联系人.

Tel: 023-68757431, E-mail: xuxiang75@cta.cq.cn

收稿日期: 2001-11-29, 接受日期: 2002-01-28

同源区 (Rel homology domain, RHD), 此结构域介导亚基的二聚体化、DNA 结合、核定位和与 I κ B 的结合^[9]. NF- κ B 家族成员通常以同源或异源二聚体的形式存在于几乎所有类型的细胞中, 其中以 p50/p65 异源二聚体形式最为常见. NF- κ B 与免疫细胞的活化、T 和 B 淋巴细胞的发育、应激性反应及细胞凋亡等多种细胞活动有关^[10].

当细胞处于静息状态时, NF- κ B 同源或异源二聚体与其抑制蛋白 I κ B 结合成三聚体, 以非活性形式存在于细胞质中. I κ B 家族成员有 I κ B α /MAD-3、I κ B α 、I κ B α /P105、I κ B α /p100、I κ B α 和 BCL3 等, 这些蛋白质都包含有一个由几个锚蛋白重复区组成的结构域——ARD (ankyrin repeats domain, ARD)^[9]. BCL3 是一种核蛋白, 其作用是加强 NF- κ B 的活化, 而其他几个则在胞质中起抑制的作用.

2.2 NF- κ B 的核转入

在未受刺激细胞中, NF- κ B 与 I κ B 结合成三聚体存在于胞浆中, I κ B 掩盖了 NF- κ B 的 NLS, 使其处于无活性状态. 受到各种刺激 (如 CD40 和 TNF α 等) 后, 蛋白激酶级联反应被激活, 可导致 I κ B 氨基酸末端两个丝氨酸残基 (I κ B α 内为 Ser32、Ser36, I κ B β 内为 Ser19、Ser23) 磷酸化. 这种修饰引起 I κ B 蛋白的多泛素化 (polyubiquitination), 随之被 26S 蛋白酶小体 (proteasome) 快速降解. 在体外, 蛋白激酶 CK II 能够直接、特异地使 I κ B α 的 Ser32 和 Ser36 磷酸化^[11]. 最近有研究证实, 异源核 RNA A1 (heterogeneous nuclear RNA A1, hnRNPA1) 的氨基端 RNA 结合域, 能直接与 I κ B α 的羟基端相互作用, 从而使 I κ B α 快速、大量降解^[12]. 不管怎样, 所有导致 I κ B 家族成员降解的机制, 都可产生一种相同的下游影响, 即 NF- κ B 二聚体的激活. 在 IL-1 刺激后情况有所不同, IL-1 可诱导磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K) 表达. PI3K 的活性亚基 p110 的表达可诱导 p65 磷酸化, 从而协助 NF- κ B 活化^[13]. 活化的 NF- κ B 与 I κ B 分离, 其 NLS 被暴露. 胞质受体 importin α/β 可识别 NLS, 并与之结合形成核转入复合物, 停靠 (docking) 于 NPC 纤丝的胞质面. 纤丝运动将复合物送入核孔中央, 并以能量依赖的形式转位于核内. 入核后的复合物依赖与 RanGTP 的结合将 NF- κ B 释放. NF- κ B 在核内可激活其应答基因, 调控该基因的表达.

2.3 I κ B 的核转入

在未受刺激细胞中, 当 I κ B α 的表达水平高于 NF- κ B 时, 胞质内就存在游离的 I κ B α . 在刺激细胞中, 入核的 NF- κ B 可诱导 I κ B α 的转录表达, 使 I κ B α 大量生成. I κ B α 是一种分子质量为 37 ku 的小分子蛋白, 按理论推测可以自由进入细胞核 (理论上核孔允许分子质量小于 40 ku 的分子自由通过). 实际研究表明, 情况并非如此. I κ B α 有一个表面暴露的氨基端结构域, 随后是一个含 5 个 ARD 的蛋白酶抗性 (protease-resistant) 结构域, 并通过一个柔性接连物与富含酸性氨基酸残基的羧基端结构域相连接. 中心锚蛋白结构域和连接域对于 I κ B α 与 NF- κ B 的相互作用是必不可少的. ARD 的存在是 I κ B 蛋白的共同特征. I κ B α 的 ARD 可能与包含碱性 NLS 的辅助蛋白相互作用. 该辅助蛋白能被碱性 NLS 受体 importin α/β 异源二聚体识别, I κ B α 经一种背负机制 (piggy-back) 入核^[14]. 已经有报道解释蛋白质入核的类似背负机制. 例如, 鼠 DNA 引物酶 46 ku 亚基并没有 NLS, 但因与 54 ku 亚基的相互作用而入核, 而 54 ku 亚基携带有一碱性 NLS^[15].

在未受刺激细胞中, I κ B β 并无核转入能力. 但在某些刺激条件下 I κ B β 被降解, 随之又重新合成. 新合成的 I κ B β 与 NF- κ B 结合, 但其并不掩盖 NF- κ B 的 NLS 和 DNA 结合域, 复合物可在 NLS 的介导下入核, 激活应答基因的表达^[16]. I κ B 家族的另一成员 BCL3 的氨基端有 2 个碱性 NLSs, 故其在核内呈优势表达. 在胞质中, BCL3 与 NF- κ B p50/p52 同源二聚体呈优势结合, 这种结合也不掩盖 NF- κ B 的 NLS, 故也可使复合物在 NLSs 的介导下入核^[17].

2.4 NF- κ B/I κ B 的核转出

大量入核的 I κ B α 在核内积聚, 并通过与 NF- κ B 的重新结合而抑制 NF- κ B 与 DNA 的相互作用. 核内积聚的 I κ B α 不易被磷酸化, 其氨基端有一富含亮氨酸的核转出信号 N-NES. N-NES 被核蛋白 CRM1/exportin-1 特异性识别, CRM1 可促进含有 NES 蛋白的核转出. NF- κ B / I κ B α 复合物在 NES 的介导下以 CRM1 依赖的途径经 NPC 从胞核转运回胞质. 这个核转出过程能够被 NES 的抑制剂 leptomycin B (LMB, 一种链霉素代谢产物) 所阻断 (图 1)^[18].

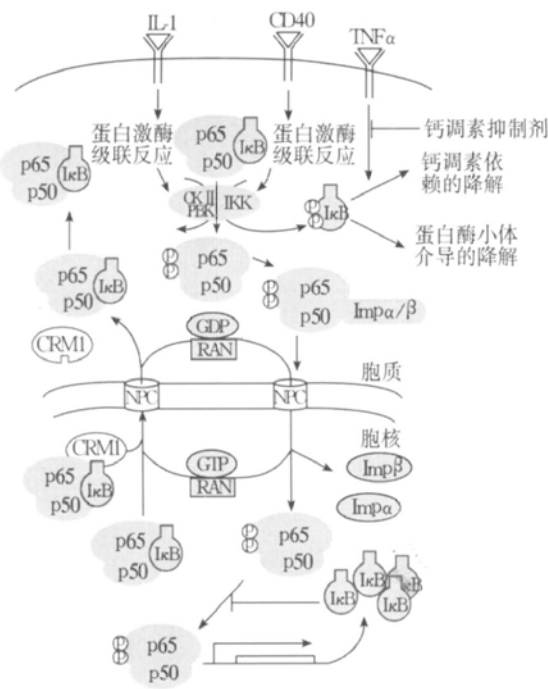


Fig. 1 Model of nucleocytoplasmic transport of NF-κB/IκB^[18]

图 1 NF-κB/IκB 跨核膜转运模式图^[18]
p: 磷酸化, —: 抑制, —: 诱导.

3 NF-κB/IκB 核转运的调控

3.1 NF-κB 和 IκB 的相互影响

对 NF-κB / IκBα 复合物晶体结构的研究发现, IκBα 可通过空间位阻掩盖 NF-κB 的 NLS, 使胞质受体不能接近并识别 NLS, 从而使 NF-κB 滞留于胞质内. 已知 ARD 对于 IκBα 的入核至关重要. 已有研究证实 IκBα 的核转入, 需要第二锚蛋白重复区内完整的疏水残基. 由于复合物结合面掩盖了 IκBα 的锚蛋白重复区, 使之不能转位入核^[19]. 总之, NF-κB/IκB 复合物在胞质中的停留, 是由于两种蛋白质相互掩盖了参与核转入的序列所致.

3.2 IκBα 的入核受自身 ARD 的调节

ARD 是 IκB 家族的特征性结构. 已知 IκBα 和 BCL3 的入核依赖于与之结合的 NF-κB 的或自身的碱性 NLSs, 而并不涉及 ARD, 但 IκBα 的入核受自身 ARD 的调节. Turpin 等^[14]分析了绿色荧光蛋白 (GFP) 和 IκBα 不同结构域的融合蛋白, 在瞬时转染的 HeLa 细胞中的分布. 结果显示, 包含 ARD 的融合蛋白在核和胞质内都有分布, 且核内的信号要强得多. 而缺乏 ARD 的融合蛋白没有在核内积聚. 此外在缺乏 NF-κB 的成纤维细胞中, 发现核内存在 IκBα. 这说明, IκBα 的 ARD 对于其入核是必要且充分的, 而且其入核不依赖于 NF-κB

家族成员.

3.3 IκBα 的 N-NES

Winnie 等^[20]在对 IκB 家族成员的不同作用机制的研究中指出, 在未受刺激细胞中, IκBα 具有跨核膜穿梭能力, 而 IκBβ 和 IκBε 不具有该能力. 在胞质内, p50/p65 的 NLS 被 IκBα 所掩盖, 其中 p50 的 NLS 被 IκBα 的柔性氨基端所掩盖, 复合物滞留于胞质中. 由于 IκBα 的氨基端具有柔韧性, 故其对 p50 NLS 的掩盖是瞬时的或有遗漏的, 部分 p50 NLS 被暴露, 从而导致复合物在该 NLS 的介导下入核. 一旦入核, IκBα N-NES 被 CRM1 特异性识别, 导致复合物被转运出核. 这种有效的核转出加强了复合物在胞质内的优势定位. 因此, 非活性 NF-κB/ IκBα 复合物的亚细胞定位不是静止的, 而是在胞核、胞质间动态穿梭 (图 2)^[6]. 而且核内 NF-κB/ IκBα 复合物由于没有 DNA 结合能力而处于失活状态. 由于 IκB 激酶 IKK 不具有核转运能力, 导致核内复合物不能获得上游激酶的信号.

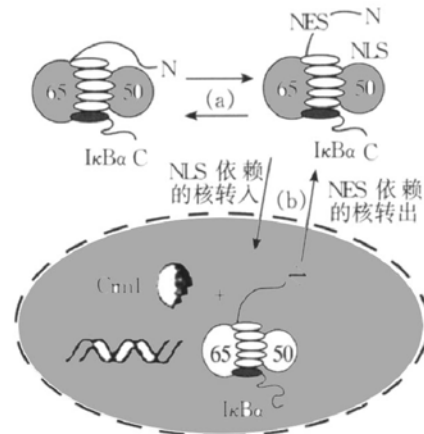


Fig. 2 Model of nucleocytoplasmic transport of the inactive NF-κB / IκBα complexes

图 2 非活性 NF-κB / IκBα 复合物跨核膜转运图

(a) IκBα 的 N-NES 对 p50 NLS 的掩盖和暴露; (b) NLS 依赖的核转入和 NES 依赖的核转出.

4 结 语

对于 NF-κB 及其抑制蛋白 IκB 核转运机制的研究表明, 核转运可以作为一种重要的调控方式控制着细胞的生理过程. 核转运对于 NF-κB 功能发挥的多层次调控证明了这一点. 这一结果不但增加了我们对 NF-κB 调控的理解, 还有可能提供一种新的靶向药物以选择性地抑制 NF-κB 的功能, 下调其应答基因的过度表达, 从而为抑制炎症介质的

过度生成提供了新的线索, 具有重要的理论意义和利用价值.

参 考 文 献

- Vasu S K, Forbes D J. Nuclear pores and nuclear assembly. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, **13** (3): 363~ 375
- Gorlich D, Kutay U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999, **15**: 607~ 660
- Nakiyelny S, Dreyfuss E. Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell*, 1999, **99** (7): 677~ 690
- Weis K. Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. *Trends Biochem Sci*, 1998, **23** (5): 185~ 189
- Sachdev S, Bagechi S, Zhang D D, *et al.* Nuclear import of I κ B α is accomplished by a ran-independent transport pathway. *Mol Cell Biol*, 2000, **20** (5): 1571~ 1582
- Huang T T, Kudo N, Yoshida M, *et al.* A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I κ B α controls cytoplasmic localization of inactive NF- κ B/I κ B α complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (3): 1014~ 1019
- Prigent M, Barlat I, Langen H, *et al.* I κ B α and I κ B α /NF- κ B complexes are retained in the cytoplasm through interaction with a novel partner, RasGAP SH3-binding protein 2. *J Biol Chem*, 2000, **275** (46): 36441~ 36449
- Conti E, Lzaurrealde E. Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, **13** (3): 310~ 319
- Foo S Y, Nolan G P. NF- κ B to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. *Trends Genet*, 1999, **15** (6): 229~ 235
- Baeuerle P A, Baltimore D. NF- κ B: ten years after. *Cell*, 1996, **87** (1): 13~ 20
- Taylor J A, Bren G D, Pennington K N, *et al.* Serine 32 and serine 36 of I κ B α are directly phosphorylated by protein kinase CK II *in vitro*. *J Mol Biol*, 1999, **290** (4): 839~ 850
- Hay D C, Kemp G D, Dargemont C, *et al.* Interaction between hnRNP A1 and I κ B α is required for maximal activation of NF- κ B-dependent transcription. *Mol Cell Biol*, 2001, **21** (10): 3482~ 4390
- Sizemore N, Leung S, Stark G R. Activation of phosphatidylinositol 3 kinase in response to interleukin 1 leads to phosphorylation and activation of the NF- κ B p65/RelA subunit. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (7): 4798~ 4805
- Turpin P, Hay R T, Dargemont C. Characterization of I κ B α nuclear import pathway. *J Biol Chem*, 1999, **274** (10): 6804~ 6812
- Mizuno T, Okamoto T, Yokoi M, *et al.* Identification of the nuclear localization signal of mouse DNA primase: nuclear transport of p46 subunit is facilitated by interaction with p54 subunit. *J Cell Sci*, 1996, **109** (Pt11): 2627~ 2636
- Suyang H, Phillips R, Douglas L, *et al.* Role of unphosphorylated, newly synthesized I κ B β in persistent activation of NF- κ B. *Mol Cell Biol*, 1996, **16** (10): 5444~ 5449
- Zhang Q, Didonato J A, Karin M, *et al.* BCL3 encodes a nuclear protein which can alter the subcellular location of NF- κ B proteins. *Mol Cell Biol*, 1994, **14** (6): 3915~ 3926
- Cartwright P, Helin K. Nucleocytoplasmic shuttling of transcription factors. *Cell Mol Life Sci*, 2000, **57** (8~ 9): 1193~ 1206
- Huxford T, Huang D B, Malek E, *et al.* The crystal structure of the I κ B α /NF- κ B complex reveals mechanisms of NF- κ B inactivation. *Cell*, 1998, **95** (6): 749~ 758
- Winnie F T, Ranjan S. I κ B family members function by different mechanisms. *J Biol Chem*, 2001, **276** (11): 7701~ 7704

Nucleocytoplasmic Transport of Nuclear Factor κ B and Its Regulatory Mechanisms*

SHEN Li-Qun^{1,2)}, XU Xiang^{1)**}, LÜ Feng-Lin¹⁾, LIANG Hua-Ping¹⁾

¹⁾ Research Institute of Surgery, Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China;

²⁾ The 153th Hospital, The People's Liberation Army of China, Zhengzhou 450042, China)

Abstract Nuclear factor κ B (NF- κ B) is an important transcriptional factor and maintains in a cytoplasmically localized inactive state by the inhibitory protein κ B (I κ B). Following stimulation, NF- κ B and I κ B import into nucleus through nuclear pore complexes (NPC), mediated by nuclear localization signal (NLS), respectively. In nucleus, I κ B binds to NF- κ B again. Dependent on the CRM I pathway, the complexes export from nucleus to cytoplasm, mediated by nuclear export signal (NES). Nucleocytoplasmic transport of complexes is an energy-dependent process which involves small Ran protein and several soluble factors.

Key words nuclear factor κ B (NF- κ B), inhibitory protein κ B (I κ B), nucleocytoplasmic transport, nuclear localization signal (NLS), nuclear export signal (NES)

* This work was supported by grants from the Special Funds for Major State Basic Research of China (G1999054203), the National Natural Science Foundation of China (30080009) and Chongqing Science Commission Funds (2000-6319).

** Corresponding author. Tel: 86-23-68757431, E-mail: xuxiang75@cta.cq.cn

Received: November 29, 2001 Accepted: January 28, 2002