

进入细胞核之门：核移位机制研究进展

罗湘建 曹 亚*

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 细胞中 DNA 复制和 RNA 生物形成发生在细胞核, 而蛋白质的合成场所位于细胞质, 这些生命活动的整合依赖于功能蛋白等在两个亚空间尺度的选择性穿梭. 这是一个信号介导的过程, 需要能量和可溶性因子如穿梭载体的参与. 通过介绍功能蛋白受控核移位机制研究进展, 拓宽了其潜在的医学应用, 该领域的深入研究, 将有力推动抗病毒治疗和基因治疗载体的设计研究.

关键词 核孔复合物 (NPC), GTP 酶 Ran, 核定位信号序列 (NLS), 核移位

学科分类号 Q291

真核细胞中, 胞核和胞质被核膜所间隔, 由此导致细胞内的空间分隔. DNA 复制和 RNA 生物形成发生在细胞核, 而蛋白质的合成场所位于细胞质. 在呈指数增长的细胞中, 每分钟都有成百上千的蛋白质和核糖核酸蛋白复合体通过核孔复合物 (nuclear pore complex, NPC) 出入细胞核. 这是一个信号介导的过程, 依赖于能量和可溶性因子如穿梭载体的参与. 因此, 需要一套有效的分子机制调控生物大分子在细胞核质间有效地转运, 实现对细胞整体活动的调控.

1984 年, 通过对缺乏核定位功能的 SV40 大 T 抗原突变体的研究, 在分子水平第一次明确了核定位信号序列 (nuclear localization signal, NLS). 该突变病毒在大 T 抗原基因处有一处点突变 Lys¹²⁸-Asn. 基于大量的实验证实, Lys¹²⁸ 附近的一小段短氨基酸序列 Pro-Lys-Lys¹²⁸-Lys-Arg-Lys-Val, 起到了核定位信号的作用^[1]. 这一发现有力推动了核蛋白输入机制的细胞生物学研究进程. 1994 年~1995 年, 即 NLS 被发现 10 年后, 与核蛋白输入相关的转运载体因子逐步被鉴定出来. 最初的发现是携带 NLS 序列的 SV40 T 抗原和其底物间形成了一种稳定的复合物靶向 NPC. 该复合物包含两个必备组件, 入孔素 α 和入孔素 β , 由于它们是由多个研究小组独立发现的, 因此亦分别称为 Karyopherin α 和 β , NLS 受体和 p97, PTAC58 和 97^[2]. 1996 年~1999 年, Gorlich 和 Mattaj 等对另外一个活化核移位的

关键因子 GTP 酶 Ran 的研究, 使核移位系统的组成轮廓逐渐清晰^[3,4].

1 核移位系统组成

核移位系统主要包括: 携带 NLS 的功能蛋白, NPC, 转运载体, 小分子 GTP 酶 Ran 等^[5].

NPC, 提供了直径 9 nm 的液体通道, 可以允许离子、代谢物和小分子蛋白 (相对分子质量小于 $4 \times 10^4 \sim 6 \times 10^4$) 扩散通过, 并以能量依赖方式介导直径达 26~28 nm 的生物大分子选择转运入核.

转运载体主要为穿梭蛋白, 它们在信号转导通路的调控下, 携带蛋白质分子转运入核后, 又返回胞质. 在核移位机制中, 通常载体的作用被认为是介导结构千差万别的功能蛋白和通用性的 NPC 介导转运机制间相互作用的接头. 穿梭蛋白包括入孔素 α 、hnRNP 蛋白 A1 和核素 (nucleolin) 等.

小分子 GTP 酶 Ran, 是 ras 超家族中小分子 GTP 酶的成员之一, 在哺乳动物细胞中含量丰富, 约 10^7 拷贝 / 细胞^[6]. Ran 在细胞中有两种存在状态, Ran-GTP 和 Ran-GDP, 通过选择性地与靶蛋白结合, 介导多蛋白质间相互作用, 在靶蛋白核输入机制中发挥重要的调控作用. 而且, 核输入中能量的消耗大多来源于 Ran 对 GTP 的水解. 细胞质中 Ran

* 通讯联系人. Tel: 0731-4805448, E-mail: ycao98@public.cs.hn.cn

收稿日期: 2006-04-03, 接受日期: 2006-06-05

主要以 GDP 结合状态存在, 而核中 Ran-GTP 占主导地位. GTP 酶 Ran 跨越核膜并呈现显著的浓度梯度, 即核内处于高浓度, 而胞质区低浓度. 这一点对于生物大分子穿越 NPC 转运入核非常重要. 来自基因组和生物化学的证据显示, Ran 和它的调控子在核输入机制中不可或缺. Ran 的调控子包括 RanGAP1 和 RCC1^[26]. RanGAP1, 一种 GTP 酶的活化蛋白, Ran 作为一种 GTP 酶, 其内在的酶活性很低, 而 RanGAP1 可以显著激活 Ran 的酶活性. RCC1, 是一种鸟嘌呤 G 交换因子, 可以激活与 Ran 结合的 GDP 被 GTP 取代. RanGAP1 和 RCC1 具有显著的空间分布特异性, 前者主要位于胞质, 后者主要集中于胞核.

在功能蛋白的核转运过程中, 将携带 NLS 的靶蛋白锚定到 NPC 的过程需要借助异源二聚转运载体, 而穿越 NPC 依赖于 Ran-GTP/GDP 状态转换和小分子蛋白 NTF2 (nuclear transport factor 2)^[78]. 如当转运载体入孔素 α/β 结合到靶蛋白的 NLS 上时则启动了入核机制, 继而靶蛋白、入孔素 α/β 复合物通过 NPC 移位到细胞核内, 核内 RanGTP 与入孔素 β 的结合则导致复合物的分离.

2 功能蛋白受控核移位机制及模式

研究表明, 核转运速率及 NPCs 的直径在增殖细胞中要远高于静止细胞, 而在转化细胞中则增幅更加明显, 这提示蛋白质核移位过程受到细胞内外因素的调控^[9]. 许多蛋白激酶在 MAP 激酶、PKC 异构物作用下, 其胞浆、核分布会发生改变. 细胞周期调控蛋白激酶 p34/cyclinB 在有丝分裂启动前会发生显著的核移位等, 但其中的作用机制尚不清楚. 关于生物大分子调控入核的研究主要集中于信号通路中靶蛋白受控核移位, 这些靶蛋白通常为激酶、磷酸酶或转录因子^[10]. 许多著名信号转导通路中, 靶蛋白在外界信号刺激下(如荷尔蒙和生长因子), 由胞质转位入核. 核移位过程主要涉及到配体结合, 磷酸化和蛋白质水解等核心事件.

转录因子 STATs 可以被大量细胞因子和生长因子所活化. Schindler 等^[11]研究表明, 在 IFN- α 作用前, STAT 位于胞质. IFN- α 介导的信号通路可磷酸化 STAT1 α 、STAT1 β 和 STAT2 位于羧基端 SH2 结构域中的酪氨酸位点, 诱导 STATs 快速转位入核. Tao 等^[12]研究表明, EB 病毒编码 LMP1 (latent membrane protein 1) 可调控携带 NLS 序列的 EGFR 发生核移位, 该过程为配体非依赖性.

2.1 功能蛋白受控核移位机制

通常, 功能蛋白受控转运入核主要基于两大机制: 一是靶蛋白的锚定和释放, 即蛋白质分子最初被锚定蛋白固着于胞质或胞膜上, 当蛋白质底物被磷酸化(或去磷酸化)后, 则启动靶蛋白从锚定蛋白上释放出来, 移位入核.

转录因子 SREBPs (固醇调控元件结合蛋白) 通常位于内质网膜上, 当细胞内固醇消耗时, 内质网膜上的 SREBPs 跨膜域发生蛋白质水解, 断裂分离, 转位入核, 反式激活基因表达, 以维持细胞内固醇水平^[13]. 细胞膜和许多转录因子和信号转导蛋白激酶的胞质定位密切相关. 非活化的 PKA 全酶定位于胞质域的亚细胞器膜上, 当激素刺激时, PKA 的调控亚单位与 cAMP 结合, 然后释放活化的催化亚单位, 通过扩散转位入核, 在核内磷酸化 CREB 和其他的转录因子, 调节基因表达^[14].

另一机制是关于靶蛋白 NLS 序列的隐藏和显露. NLS 的活性来自其分子中一段短短的由碱性氨基酸残基组成的肽段. 当这个肽段与抑制蛋白结合时, 核定位信号序列就失去作用. 细胞外的信号刺激可以使抑制蛋白从核定位信号序列上解离下来, 使 NLS 序列重新显露, 蛋白质分子得以进入细胞核. 转录因子 NF κ B 和其抑制蛋白 I κ B 家族成员相互作用, 导致其 NLSs 被掩盖. NF κ B/Rel 的核移位需要 I κ B 的失活, 而这通常需要借助 I κ B 磷酸化和蛋白质水解的过程^[15]. 令人感兴趣的是, I κ B 包含核输出序列 NES, 可通过负反馈环中止 NF κ B 信号通路. NF κ B 一入核后, 即诱导 I κ B 的表达, 胞质中新合成的 I κ B 会入核, 抑制 NF κ B 与 DNA 结合, 并促进 NF κ B 核输出^[16].

大多数靶蛋白的 NLS 功能受磷酸化作用调节. NLS 功能失活可能来源于 NLS 序列内或其邻近位点氨基酸残基的直接磷酸化.

14-3-3 蛋白可以在某一细胞域内扣留磷酸化蛋白, 阻止其靶向其他蛋白质. 而去磷酸化则可触发 14-3-3 蛋白的释放, 导致被扣留蛋白转移至细胞的其他区域, 如移位入核. 由此 Burchett 等^[17]推断 14-3-3 蛋白可通过锚定或扣留等方式阻止其接近胞膜或核内的靶标蛋白, 来调控具有 14-3-3 结合域的 RGS (regulators of G protein signaling) 蛋白活性. 许多蛋白质的 NLS 序列区, 非常接近与 14-3-3 蛋白的结合域. 如 FKHL1 (forkhead in rhabdomyosarcoma-like 1) 转录因子的 NLS 序列跨越了 ser253, 而 ser253 正是 Akt 的磷酸化位点.

ser253位的磷酸化给呈正电荷的 NLS 增加了一个负电荷, 可能会因此扰乱 NLS 的正常功能^[18]. 在生长因子来源的细胞系中, Akt 处于失活状态, FKHRL1 转录因子发生去磷酸化, 这时其 NLS 序列可有效地发挥功能, 促进 FKHRL1 的移位入核. 以这种方式, 14-3-3 蛋白通过干扰其底物蛋白, 如 BAD, Cdc25 和 hTERT, 与入孔素 α/β 的结合, 影响其靶标蛋白的亚细胞定位^[19]. 研究表明许多核转录因子或某些 MAP 激酶被锚定蛋白羁留在细胞质中.

在某些情况下, 如 RGS7 蛋白中, 与 FKHRL1 不同的是, 尽管其 NLS 与 14-3-3 结合位点共处于 RGS 蛋白的核心域, 但两者之间仍相距 64 个氨基酸残基, 这提示 NLS 不会被 ser264 位点磷酸化引入的正电荷干扰. 但 Burchett 等推测 14-3-3 结合到 RGS7-G β 5 蛋白上, 仍会空间阻断入孔素 α/β 接近 NLS, 如 14-3-3 与 NFAT3 作用的情形, 或通过诱导 RGS 核心域局部构象的改变, 达到干扰 NLS 的效果. 事实上根据观测, 14-3-3 结合到 RGS3 后, 尽管 14-3-3 结合基序与 RGS3 核心域相距甚远 (大于 100 个氨基酸残基), RGS3 仍失去了与 G α 亚单位结合的能力^[20].

此外, 配体诱导 NLSs 的暴露可调控核受体的胞浆核空间分布, 如糖皮质激素受体.

当然, 有时以上两种机制结合, 共同调控功能蛋白移位入核. 如 RGS7-G β 5 蛋白入核则依赖于锚定蛋白 14-3-3 的动态调控作用^[21]. RGS7 蛋白 Ser434 的去磷酸化驱动 14-3-3 蛋白从 RGS7-G β 5 上释放出来. 两者的解离暴露出 RGS7 的 NLS 位点, 使得入孔素 α/β 与 RGS7-G β 5 的结合成为可能. 继而 RGS7 转位入核, 或在入孔素 α/β 缺失的情况下, 与膜上 GAP G α 0 亚单位结合, 调控 GIRK (G protein-coupled inwardly rectifying K⁺) 离子通道活性.

2.2 功能蛋白核移位模式

携带 NLS 序列的功能蛋白可通过穿梭载体转运入核. 如果缺乏核靶向基序, 功能蛋白则需与其他蛋白质共移位入核. 如 RGS6 的核定位依赖于热休克蛋白的表达和 RGS 域的完整性^[22]. G β 5 亚单位的核定位依赖于 RGS7 的表达, RGS7-G β 5 复合物的形成对两者的稳定表达是必需的. G β 5 缺乏容易识别的 NLS 序列, 因此 G β 5 的核定位很可能依赖于与 RGS7 蛋白的共移位.

有些小分子蛋白, 如 RGS2, RGS4 和 RGS8,

可被动扩散进入细胞核. 小分子 RGS2 的自由扩散和核内滞留依赖于它的氨基端区域^[23].

此外, 许多核受体似乎穿梭于胞核和胞质间.

3 结语与展望

随着核转运系统的明确, 信号转导通路调控功能蛋白核移位分子机制的研究已向前迈了一大步. 核移位机制及其调控模式方面的最新进展, 拓宽了其潜在的医学应用. 尤其是它可应用于靶向核内效应分子, 或者相反, 阻断特定信号转导通路分子的核移位, 并进而调控核内特定基因的表达, 影响细胞增殖和分化. 而且, 对于病毒感染中核蛋白转运机制的深入了解, 将有力推动抗病毒治疗和基因治疗载体的设计研究. 尽管由于核移位系统本身的复杂性, 众多的蛋白激酶与转录因子在细胞内外因素的作用下转位入核的机制仍不清楚. 但我们有理由相信, 随着该领域的深入研究, 生物大分子穿越细胞核之门的神秘面纱将被逐步揭开.

参考文献

- Garcia-Bustos J, Heitman J, Hall M N. Nuclear protein localization. *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1071** (1): 83~101
- Gorlich D, Mattaj J W. Nucleocytoplasmic transport. *Science*, 1996, **271** (5255): 1513~1518
- Yoneda Y, Hieda M, Nagoshi E, *et al.* Nucleocytoplasmic protein transport and recycling of Ran. *Cell Struct Funct*, 1999, **24** (6): 425~433
- Yoneda Y. New steps toward the nucleocytoplasmic traffic of macromolecules. *Cell Struct Funct*, 2000, **25** (4): 205~206
- Nigg E A. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature*, 1997, **386** (6627): 779~787
- Koepp D M, Silver P A. A GTPase controlling nuclear trafficking: running the right way or walking randomly?. *Cell*, 1996, **87** (1): 1~4
- Paschal B M, Gerace L. Identification of NTF2, a cytosolic factor for nuclear import that interacts with nuclear pore complex protein p62. *J Cell Biol*, 1995, **129** (4): 925~937
- Corbett A H, Silver P A. The NTF2 gene encodes an essential, highly conserved protein that functions in nuclear transport *in vivo*. *J Biol Chem*, 1996, **271** (31): 18477~18484
- Feldherr C M, Akin D. Role of nuclear trafficking in regulating cellular activity. *Int Rev Cytol*, 1994, **151**: 183~228
- Karin M, Hunter T. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol*, 1995, **5** (7): 747~757
- Schindler C, Shuai K, Prezioso V R, *et al.* Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science*, 1992, **257** (5071): 809~813
- Tao Y G, Song X, Tan Y N, *et al.* Nuclear translocation of EGF receptor regulated by Epstein-Barr virus encoded latent membrane

- protein I. *Science in China*, 2004, **47** (3):258~267
- 13 Wang X, Sato R, Brown M S, *et al.* SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell*, 1994, **77** (1): 53~62
 - 14 Nigg E A. Mechanisms of signal transduction to the cell nucleus. *Adv Cancer Res*, 1990, **55**: 271~310
 - 15 Baeuerle P A. Henkel T. Function and activation of NF κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 1994, **12**: 141~179
 - 16 Fritz C C, Green M R. HIV Rev uses a conserved cellular protein export pathway for the nucleocytoplasmic transport of viral RNAs. *Curr Biol*, 1996, **6** (7): 848~854
 - 17 Burchett S A. In through the out door: nuclear localization of the regulators of G protein signaling. *J Neurochem*, 2003, **87** (3): 551~559
 - 18 Brunet A, Bonni A, Zigmond M J, *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell*, 1999, **96** (6): 857~868
 - 19 Muslin A J, Xing H. 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal*, 2000, **12** (11~12): 703~709
 - 20 Niu J, Scheschonka A, Druey K M, *et al.* RGS3 interacts with 14-3-3 via the N-terminal region distinct from the RGS domain. *Biochem J*, 2002, **365** (Pt 3): 677~684
 - 21 Benzing T, Kottgen M, Johnson M, *et al.* Interaction of 14-3-3 protein with regulator of G protein signaling 7 is dynamically regulated by TNF- α . *J Biol Chem*, 2002, **277** (36): 32954~32962
 - 22 Chatterjee T K, Fisher R A. Mild heat-and proteotoxic stress promote unique subcellular trafficking and nucleolar accumulation of RGS6 and other RGS proteins: Role of the RGS domain in stress-induced trafficking of RGS proteins. *J Biol Chem*, 2003, **278** (32): 30272~30282
 - 23 Heximer S P, Lim H, Bernard J L, *et al.* Mechanisms governing subcellular localization and function of human RGS2. *J Biol Chem*, 2001, **276** (17): 14195~14203

Through The Door to The Nucleus: Progress on Nuclear Translocation Mechanism

LUO Xiang-Jian, CAO Ya*

(Cancer Research Institute in Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract DNA replication and RNA biogenesis happen in the cell nucleus, while protein synthesis occurs in the cytoplasm. Integration of these activities depends on function proteins' selective transport between the two sub-dimensions. It is a signal mediated process, which needs energy and the participation of soluble factors. By introduction of progress on function protein regulated nuclear translocation, its potential medical application has been explored. With deeper investigation in this field, it will significantly promote the design of anti-virus and gene vector therapy.

Key words nuclear pore complex (NPC), GTPase, Ran, nuclear localization signal (NLS), nuclear translocation

*Corresponding author . Tel: 86-731-4805448, E-mail: ycao98@public.cs.hn.cn

Received: April 3, 2006 Accepted: June 5, 2006