

• 文献综述 •

蛋白磷酸化对胞核因子- κ B 活化的调节欧和生 综述 廖端芳^① 唐朝枢 审校

(北京医科大学第一医院心血管基础研究所, 北京 100083)

主题词 蛋白磷酸化; 胞核因子- κ B; 基因转录

摘要 可逆性蛋白磷酸化由蛋白激酶和蛋白磷酸化酶共同参与调节,它是各种细胞活动过程中信号传递的重要机制之一;胞核因子- κ B 以非活性状态存在于胞浆中,它与抑制性蛋白结合成复合物;蛋白激酶对抑制性蛋白的磷酸化是胞核因子- κ B 活化的重要方式,许多因素通过影响蛋白磷酸化来调节胞核因子- κ B 的活化、核转位及其与 DNA 的结合,从而影响靶基因的转录调节。

可逆性蛋白磷酸化/去磷酸化普遍存在于各种细胞活动过程中,并参与许多细胞反应过程的调节。蛋白磷酸化是由蛋白激酶将磷酸基团转移到底物蛋白的共价修饰过程,它调节酶的活性或生物学功能;蛋白激酶包括丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶和酪氨酸蛋白激酶两大类,它不仅影响许多生化酶的活性而参与糖、脂肪和蛋白质等物质代谢,而且参与各种信号传递,影响转录因子活性及其核转位,调节靶基因的转录激活。过去认为胞核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)是参与调节免疫球蛋白轻链基因表达的调节分子,但越来越多的资料表明该因子还参与了许多其它系统的细胞反应过程。新近的研究显示各种激酶诱导的可逆性蛋白磷酸化对 NF- κ B 的活化起着重要、甚至是关键性的调节作用。

1 胞核因子- κ B 的性质

十多年前,人们就了解到 NF- κ B 是一种蛋白,能结合于特定的 DNA 位点,促进免疫球蛋白轻链基因表达^[1]。目前已知 NF- κ B 是同种或异种二聚体蛋白,该蛋白属于 Rel 家族成员;Rel 家族成员的共同特点是具有一段由300个氨基酸组成的 Rel 同源区^[2]。在哺乳动物细胞中,该家族具有原癌基因 v-rel,其对应的细胞基因编码蛋白包括 c-Rel、p105(p50), p100(p52), p65 和 RelB。在果蝇属发现两种 Rel 蛋白:Dorsal 蛋白和 Dif 蛋白,后者是在免疫反应中起重要调节作用的诱导型转录因子。NF- κ B/Rel 转录因子在绝大多数细胞浆中以非活性胞浆蛋白的形式存在,因为胞浆中有一种相应的抑制性蛋白(inhibitory subunit of NF- κ B, I κ B)与之结合,形成胞浆 NF- κ B-I κ B 复合物^[3]。NF- κ B 的活性可被一系列信号所诱导,包括丝裂素、细胞因子、细菌脂多糖、病毒蛋白、双股 DNA 及紫外光等^[4]。这些信号的共同靶分子是胞浆中的 NF- κ B-I κ B 复合物。用 NF- κ B 活性诱导剂刺激细胞可导致 I κ B 蛋白磷酸化并降解,从而释放出 NF- κ B,并使之转位入胞核启动基因转录^[1,2];蛋白激酶对抑制性蛋白 I κ Bs 的磷酸化十分关键,某些 NF- κ B/Rel 蛋白,尤其是 p65 也在 NF- κ B 活化过程中被磷酸化,这些蛋白磷酸化过程的特点及其对 NF- κ B 活性的调节作用是十分令人关注的问题。

2 胞核因子- κ B 的激活及其蛋白磷酸化调节2.1 胞核因子- κ B 的激活

胞核因子- κ B 激活是细胞在各种有害刺激作用下细胞反应的一部分,可由许多因素所诱导,如细胞因子、细菌脂多糖、病毒感染、T/B 细胞交叉抗原的受体、佛波酯、放射线、自由基和线粒体超载等。转录因子 NF- κ B 家族对基因的调节是多种多样的,可能参与的过程包括免疫反应、炎症反应、细胞粘附和生长调控。最近人们发现 NF- κ B 活化也参与细胞死亡(包括坏死和凋亡)的过程^[5]。

胞核因子- κ B 早期被认为具有淋巴组织特异性,因为它常出现于 B 细胞中。然而现已知它几乎存在于所有的细胞浆中,并被抑制性蛋白 I κ Bs 所封闭。无论何种因素激活 NF- κ B,都必须首先解除 I κ Bs 的封闭作用。目前已知 I κ Bs 家族成员有9种,其中最引人关注的有 I κ B α 、I κ B β 和新近发现的 I κ B ϵ 。在 I κ B α 中主要有两个丝氨酸位点 S32 和 S36 易被磷酸化;有趣的是,S32 和 S36 位被苏氨酸取代后,I κ B α 的蛋白磷酸化和降解均明显降低。在 I κ B β 中磷酸化位点主要在 S19 和 S23,但其磷酸化速度明显低于 I κ B β ^[6];I κ B ϵ 也有同样的丝氨酸磷酸化位点^[5]。

2.2 蛋白磷酸化对胞核因子- κ B 的激活的调节

随着磷酸化位点及作用的阐明,人们将能系统地研究蛋白激酶对 I κ Bs 磷酸化在 NF- κ B 激活中的作用。1996 年 Chen 等^[7]首先报道了从非刺激状态的 HeLa 细胞浆提取物中,提取一种相对分子质量为 700×10^3 的高分子激酶复合物,该复合物能专一地使 I κ B α 中的 S32 和 S36 磷酸化。最近对 I κ Bs 激酶的研究有了明显进展,包括对其分子的克隆和功能分析。例如肿瘤坏死因子(TNF- α)诱导产生一种 $500 \times 10^3 \sim 900 \times 10^3$ 的 I κ B 激酶(I κ B kinase, IKK),它是由某些多肽组成的复合物,其中两个多肽的相对分子质量分别为 85×10^3 和 87×10^3 。通过肽链测序,发现 85×10^3 多肽就是以前所克隆的、曾被称为 CHUK 的丝—苏氨酸蛋白激酶。应用同样的方法对 87×10^3 多肽也进行了克隆。两种多肽均含有一个氨基端水解位点,由于许多功能的新发现,CHUK 被重新命名为 IKK α ,而 87×10^3 多肽则被命名为 IKK β 。

应用体外磷酸化可研究 IKK α 和 IKK β 相关激酶的特异

① 衡阳医学院药理学教研室,衡阳 421001

性。IKK α 中的 S32 和 S36 具有同样的磷酸化速率,而 IKK β 中丝氨酸位点的磷酸化较慢^[8],且主要位于 S23^[9]。IKK 复合物的磷酸化具有很强的丝氨酸位点选择性,如用苏氨酸取代 IKK α 中的 S32 和 S36 位点的丝氨酸,磷酸化效应明显降低。IKK 复合物的激酶活性可由 TNF- α 、IL-1 和 PMA 快速激活,其活化的速度与正常细胞中的 I κ B α 磷酸化和降解的速度一致,提示 IKK 是体内一种重要的激酶,但它在细胞中的活化机制目前尚不清楚。有报道 IKK 活性对磷酸酯酶 PP2A 的处理很敏感^[8],提示激酶可调节它的活性。在信号传递系统中 TNF 和 IL-1 受体下游分别为 TNF 受体相关因子 (TNF receptor-associated factor, TRAF) -2 和 TRAF-6,它们虽然具有一段同源的羧基端区域,但与其结合的成分和激活不同。如 TRAF-2 参与 TNF 对 NF- κ B 的激活,TRAF-6 则介导 IL-1 对 NF- κ B 的激活。不同的途径可汇集于 NF- κ B 诱导型激酶 (NF- κ B inducing kinase, NIK)。NIK 类似于丝裂素活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 途径中的 MAP3K^[10],当其过量表达时快速激活 NF- κ B,应用反义 IKK α 或无激酶活性 IKK α /IKK β 突变株可抑制 TNF 或 IL-1 诱导的 NF- κ B 转录活性^[8,9]。但是无激酶活性 IKK 突变株对 NF- κ B 活化的抑制程度可以不同,例如 Regnier 等^[9]报道 IKK α 和 IKK β 降解失活后能独立地阻断 TNF 或 IL-1 所诱导的基因激活;而 Mercurio 等^[11]报道 IKK 激酶突变株却只有微小的抑制效应。此外,在 TNF 处理的细胞中 IKK β 突变株对 p65 的核转录具有强烈的抑制作用^[11,12]。然而 IKK α 突变株的作用不同,这也许是由于测定方法的差异所致,也可能说明 IKK β 的作用比 IKK α 更强烈。尽管如此,IKK α 和 IKK β 对 IKK 的活性都是必不可少的。

用免疫沉淀法可显示 IKK α 和 IKK β 存在两个同种分子或异种分子之间的相互作用^[11,12],主要发生在 NF- κ B-I κ B 复合物之间。螺旋-环-螺旋 (helix-loop-helix,) 区域对该激酶的活性很重要,但它并不影响 IKK α 与 IKK β 之间、或 IKK α / β 与 NIK 之间的相互作用。IKK α 和 IKK β 都含有类似 MAP2K 活化环状结构 (SxxxS),这种环状结构如果发生突变,就会明显影响 IKK β 的活性。

IKK α 和 IKK β 对 I κ B 的磷酸化极为关键。体外实验已明确显示 IKK α 和 IKK β 能特异地使 I κ B 中关键性的丝氨酸位点发生磷酸化,无论是细胞内激酶的过量表达还是给予网织红细胞的体外输入,都导致这种结果。由于激酶对 IKK 复合物中其它蛋白成分也有亲和性并可导致磷酸化,因此体外实验也用于 IKK α 和 IKK β 对其它蛋白成分的作用。也许 IKK α / β 并不是直接使 I κ B 磷酸化的激酶,而更可能是参与激酶的激活、或者参与这种激酶对 I κ B 的特异性。要解决这一问题,就必须确定 IKK 复合物中其它成份的性质和特点,并阐明体外 I κ B 磷酸化的途径。

前述 1996 年 Chen 等^[7]首先发现一种 700×10^3 大小的 I κ B 激酶复合物,该复合物与 IKK 复合物之间的关系尚不清楚。泛因子 (ubiquitin) 是这种激酶活化所必需,而 IKK 的激活并不必需泛因子,推测泛因子与蛋白磷酸化一起形成了 I κ B 激酶复合物活化途径的选择性。TNF 诱导的 IKK 复合

物激酶活化,可能只需要磷酸化而无需泛因子的参与。通过改变细胞提取物的提取方式,在 TNF 处理的细胞中可发现一种类似于泛因子诱导的 700×10^3 大小的 I κ B 激酶^[13]。同样的复合物在体外非刺激的细胞中提取后,也可被 MAPK/细胞外信号相关激酶激酶激酶-1 (extracellular signal-related kinase kinase kinase-1, ERK kinase kinase-1, MEKK1) 选择性激活,这提示 MAPK 途径也参与调节该复合物激酶的活化。已知 MEKK1 的过量表达导致 I κ B (在 S32/S36 位点的磷酸化,而无活性 MEKK1 突变株对 NF- κ B 激活的抑制作用机制尚不清楚。值得注意的是 MEKK1 可作为亚单位之一紧密结合于 IKK 复合物中,与另一种蛋白 MAPK 磷脂酶 1 一起参与 MAPK 信号传递途径^[11]。在 IKK 复合物中出现 MAPK 家族蛋白的意义有待阐明。

3 问题与展望

现有的研究已明确,细胞因子诱导的激酶复合物引起 I κ B 磷酸化是转录因子 NF- κ B 活化的主要机制之一,这些激酶使 I κ B 磷酸化后发生降解,继而 NF- κ B 激活,并从胞浆转位进入胞核,与 DNA 特定部位结合后导致基因转录。其中 I κ B 磷酸化降解可能是 NF- κ B 激活过程的一个中心环节。然而存在许多问题有待阐明。首先,所有诱导可逆性蛋白磷酸化的细胞外刺激,能激活 NF- κ B,是否也能活化 IKK α 和 IKK β ;其次,最近有报道丝裂素激活核糖体 S6 蛋白激酶 (即 pp90^{rk}),其功能类似于 I κ B 激酶^[14],它可被佛波酯激活,并与 I κ B α 活化有关,因此 MAPK 途径中的相关激酶与 IKK 复合物激酶的关系有待阐明;第三,IKK α 和 IKK β 两者的抑制性蛋白磷酸化速度不一,并且对同一分子的磷酸化位点不同,这些差异的原因不清楚,是否存在蛋白激酶网络对 I κ B 降解的调控;还有,蛋白激酶网络中各种激酶的主要相互关系及其对 NF- κ B 转录活性的调控有待阐明。解决上述问题的关键是确定 IKK 复合物中各种成份的分子性状。只有在确定 IKK 复合物中各亚单位的分子性状,才能准确地确定激酶活化与 I κ B 磷酸化及 NF- κ B 激活之间的相互关系。如果能发现一种 IKK 特异性抑制物,那么这种抑制物不仅有助于分析 IKK 复合物中各组分的功能及其对 NF- κ B 活化的调节,而且将具有重大的药用价值。

参考文献

- 1 Sen R, Baltimore D. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell*, 1986, **47**: 921-928
- 2 Baldwin AS. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, 1996, **14**: 649-681
- 3 Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, et al. Rel/ NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Gene Dev*, 1995, **9**: 2 723-735
- 4 Kopp E, Ghosh S. NF- κ B and rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol*, 1995, **58**: 1-27
- 5 Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B: Ten years after.

- Cell*, 1996, **87**: 13—20
- 6 DiDonato J, Mercurio F, Rosette C, et al. Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol*, 1996, **16**: 1 295—304
- 7 Chen ZJ, Parent L, Maniatis T. Site-specific phosphorylation of I κ B by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell*, 1996, **84**: 853—862
- 8 DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, et al. A cytokine-responsive I kappa B kinase that activates the transcription factor NF-kappa B. *Nature*, 1997, **388**: 548—554
- 9 Regnier CH, Song HY, Gao X, et al. Identification and characterization of an I κ B kinase. *Cell*, 1997, **90**: 373 —383
- 10 Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, et al. Map3K-related kinase in NF-kappa B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature*, 1997, **385**: 540—544
- 11 Mercurio F, Zhu H, Murray BW, et al. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I kappa B kinase essential for NF-kappa B activation. *Science* 1997, **281**: 860—866
- 12 Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, et al. The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF-kB activation. *Cell*, 1997, **91**: 243—252.
- 13 Lee FS, Hagler J, Chen ZJ, et al. Activation of the I kappa B alpha kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell*, 1997, **88**: 213—222
- 14 Ghoda L, Lin X, Greene WC. The 90-kDa ribosomal S6 kinase (PP90^{orsk}) phosphorylates the N-terminal regulatory domain of I κ B and stimulates its degradation in vitro. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 21 281—288

(1998—09—08 收到, 1999—01—31 修回)

(此文编辑 胡必利)