

综述 Reviews

信号肽与蛋白质的分选转运

彭佳师, 龚继明*

中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 植物分子遗传国家重点实验室, 上海 200032

摘要: 蛋白质一般在位于细胞质中的核糖体内合成, 但是它们发挥生理功能的地点却分布在细胞的不同区域, 这些区域通常由蛋白质所不能自由透过的脂膜所包裹。因此, 细胞质中新合成的蛋白质必须进行准确的定向运输才能保证各项生命活动的正常运行。研究发现, 一般情况下, 新生蛋白通常在位于其N端的信号肽的指引下到达细胞特定区域, 并由其介导跨膜转运。本文重点介绍信号肽的结构、功能及作用机制等的研究成果。

关键词: 信号肽; 蛋白质分选; 信号假说; 信号肽酶; 核定位信号

The Mechanisms of Protein Sorting and Translocation Regulated by Signal Peptides

PENG Jia-Shi, GONG Ji-Ming*

National Key Laboratory of Plant Molecular Genetics, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Abstract: Proteins are primarily synthesized in the ribosomes while their physiological functions are performed in various subcellular compartments, which are separated by lipid membranes that are not freely permeable to proteins. Therefore, once synthesized in the cytoplasm, proteins must be sorted and targeted to proper functional compartments to ensure fine-tuning of essential physiological processes. Accumulating evidences have demonstrated that signal peptides, which are frequently localized at the N-terminus of nascent proteins, play an essential role in this process. The current review will summarize research progress on the structure and function of signal peptides, and focus on the mechanisms of protein sorting and translocation regulated by signal peptides.

Key words: signal peptide; protein sorting; signal hypothesis; signal peptidase; nuclear localization signal

后基因组时代一个核心任务是功能解析基因组所编码的蛋白质, 而蛋白质正确发挥作用的前提之一是在其在细胞内合成或折叠后有一个正确的分选和转运机制。人们对这一科学问题的研究始于上世纪 60 年代, 并提出了“信号假说”及“信号肽”等概念。一般认为, 每一个需要运输的多肽都含有一段氨基酸序列, 称为信号肽序列(signal peptide, SP), 引导多肽至不同的转运系统。大多数的信号肽序列在完成使命后会被信号肽酶(signal peptidase)剪切。

1 信号假说的建立

细胞内存在稳定表达的大量执行关键功能的蛋白, 其中多数将被转运到细胞外或定位于细胞内不同细胞器上。这就引出了两个问题: (1)新合成的蛋白如何被准确的分选至正确的细胞部位? (2)蛋白如何跨过围绕细胞和细胞器的膜结构(Heemels 1999)?

20世纪70年代初, Blobel与同事在研究蛋白质如何定位于内质网的过程中, 提出了一个有关细胞内蛋白质运送的简单模型(Blobel和Sabatini 1971): 分泌蛋白内部含有保证它们正确运输和穿过脂膜到达内质网腔的信号序列。该模型为后来众多的实验证据所证实, 因此Blobel与Debberstein于1975年正式提出了“信号假说(signal hypothesis)”, 认为分泌蛋白的生物合成是在游离核糖体上开始的, 当其一端的信号肽延伸出核糖体后即被内质网膜识别并与之相结合。信号肽通过内质网膜上的通道伸入内腔, 并被信号肽酶水解。同时, 与信号肽相连的、正在合成的新生肽链则不断延伸并通过内质网膜直到合成完成。信号识别颗粒(signal recognition protein, SRP)及其受体(SRP receptor, SR)的

收稿 2010-09-04 修定 2010-10-20

* 通讯作者(E-mail: jmgong@sibs.ac.cn; Tel: 021-54924036)。

发现(Walter和Blobel 1980; Gilmore等1982)完善了该假说,因此具有里程碑的意义。随后大量的研究充分证实信号肽作用机理普遍存在于酵母、植物和动物中,从而使信号假说成为一个系统的理论,并最终获得1999年诺贝尔生理学或医学奖。

2 信号肽的结构与功能

2.1 信号肽的结构

信号肽一般位于初生蛋白N端,也可存在于蛋白内部或者C端,长度变化范围从15个氨基酸到50个氨基酸以上(von Heijne 1986; Martoglio 和 Dobberstein 1998),但还是具有共同的结构特征:带正电荷的氨基末端区域,位于中部的疏水区域以及极性很强的羧基末端区域(von Heijne 1998)。通过信号肽突变体的分析发现中间的疏水区域在蛋白的定向转运过程中发挥着极其重要的作用,当其中的一个氨基酸被非极性氨基酸置换时,信号肽即失去功能(von Heijne 1985; Martoglio 和 Dobberstein 1998),这对于基因工程改造蛋白分选途径具有重要的参考意义。羧基末端常常含有不利于螺旋形成的脯氨酸和甘氨酸,位于-1或-3位的不带电的小的氨基酸残基则决定了信号肽酶的酶切位点(von Heijne 1990)。氨基末端的极性最强,而且通常都会带正电荷。研究发现,信号肽氨基末端长度的差异是导致不同信号肽长度各异的最主要的因素(Martoglio 和 Dobberstein 1998)。

2.2 信号肽的功能

基于Blobel的“信号假说”(Blobel和Debberstein 1975)以及蛋白质氨基酸序列的比较研究,一些新的信号肽先后被发现。进一步研究表明,信号肽除了具有蛋白质定向转运功能外,还具有其他的一些生理作用。例如HIV-1外壳蛋白p-gp160的信号肽在酶剪切以后释放至细胞质中,通过与钙调蛋白的相互作用可能会抑制钙调蛋白依赖的相关通路(Martoglio等1997)。

随着研究的深入,信号肽概念的范围随之扩大。如新生蛋白的化学修饰也是转译后加工的一个重要内容,发生修饰的残基不是任意的,从这个意义而言,这些和残基修饰有关的肽段,也可认为是残基修饰的信号肽。还有一些肽段与该肽链的降解有关,这类肽段可以视为肽链降解的信号肽。如细胞质中某些带有KFERQ/RIDKQ序列的蛋白质

易进入溶酶体中被降解(韦雪芳等2006)。

3 信号肽的作用机制

信号肽介导的蛋白质转运可分为两大类:若某个蛋白质的合成与转运是同时发生的,则属于翻译-转运同步机制;如蛋白质从核糖体上释放后才发生转运,则属于翻译后转运机制。此外,本文还将略述一种比较特殊的翻译后转运机制:蛋白质的入核转运。这几种转运方式都涉及蛋白质分子内部特定区域与细胞膜相关结构的相互作用。

3.1 翻译-转运同步机制

真核细胞中分泌蛋白及一些膜蛋白的合成开始于细胞质中游离的核糖体,并随核糖体与内质网(ER)膜的结合而继续合成直至完成(Walter和Lingappa 1986)。研究发现,除了蛋白质本身的信号肽之外,信号识别颗粒及其受体在这种蛋白转运机制中也发挥了关键的作用。SRP能够识别正在从游离核糖体上合成的信号肽序列,并与之结合(Luirink和Sinning 2004; Halic和Beckmann 2005),同时导致延长的暂时终止。在胞质中形成的SRP-信号肽-核糖体复合物首先通过SRP和SR的特异性相互作用结合到ER膜上(图1),这个过程需要GTP的结合但不水解GTP(Connolly等1991),这可能是由于信号肽与SRP的结合抑制了其水解,直到信号肽-核糖体复合物与转运通道蛋白结合后这种抑制才被解除(Halic和Beckmann 2005)。需要指出的是,SRP-信号肽-核糖体复合物最终连接到ER膜上是通过核糖体与膜上的转运通道蛋白的相互作用而实现的,这个转运通道蛋白是一个保守的跨膜异源三聚体复合物,在真核细胞中称为Sec61复合体,在细菌及古生菌中称为SecY复合体(Rapoport 2007)。

SRP蛋白与其受体结合后,多肽链的延伸继续进行。待肽链合成结束后,在之前结合的GTP水解供能的作用下,SRP-SR复合体解离(Connolly等1991),并使SRP进入新一轮的循环。陆续合成的新生肽链通过与核糖体相连的通道蛋白直接进入ER腔内(图1),并在此进行新生肽链N端信号肽的酶切,形成成熟的基质蛋白。对于ER膜上的跨膜蛋白,相应的多肽片段在部分进入通道之后,与核糖体-通道蛋白复合物分离,导致蛋白质的不同部位分别位于ER膜上及两侧,从而完成跨膜定位(Mothes等1997; Rapoport 2007)。

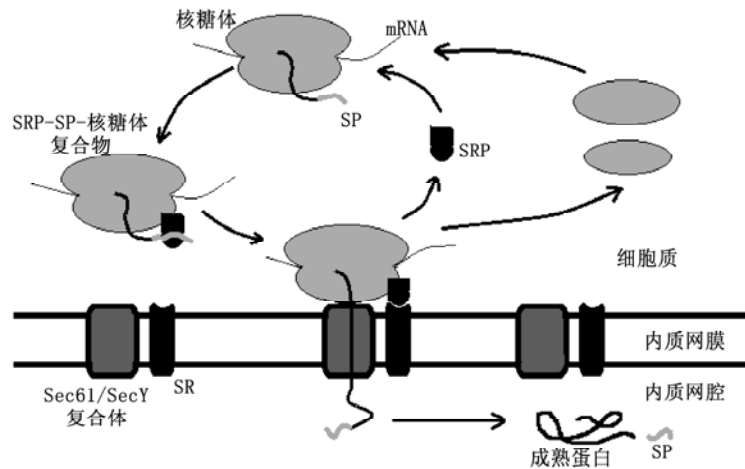


图1 新生蛋白进入内质网腔主要过程示意图

Fig.1 The schematic process of nascent protein translocation into the ER lumen

SP: 信号肽; SRP: 信号识别颗粒; SR: 信号识别颗粒受体。

液泡是植物体内重要的细胞器,至少存在两种不同的类型,即水解性液泡(lytic vacuole, LV)和蛋白储藏液泡(protein storage vacuole, PSV)。绝大多数液泡定位的蛋白质通过翻译-转运同步机制进入内质网之后进一步分选转运至高尔基体,并可能通过两条途径最终完成液泡定位:(1)前液泡/多囊泡小体(prevacuolar compartment/multivesicular body, PVC/MVB)途径定位到LV,这些蛋白先与BP-80结合,后者可以招募网格蛋白从而形成网格蛋白有被小泡(clathrin-coated vesicle, CCV)包被待运蛋白,CCV通过与PVC/MVB融合使前体蛋白释放到PVC/MVB中并最终转运至LV;(2)许多PSV定位的蛋白会在高尔基体内集中并装载进致密小泡(dense vesicle, DV),DV与PSV融合从而使蛋白定位至液泡(Vitale和Hinz 2005; Jolliffe等2005)。

3.2 翻译后转运机制

与翻译转运同步进行机制不同的是,特定条件下蛋白质在其合成结束后才开始转运,这个机制称为翻译后转运。采用这种机制定位的蛋白一般都是可溶性蛋白,它们有一段适度疏水的信号肽序列而使它们在合成时避开了SRP的识别(Huber等2005; Rapoport 2007)。研究发现,线粒体和叶绿体中的很多蛋白质多采用翻译后转运机制进入细胞器内。核基因编码的蛋白在这两种细胞器中的定位存在很多的相似性。首先,前体蛋白的正确定位都需要特异性的信号序列,在线粒体和叶绿体中分

别称为前导肽和转移肽。其次,这两种细胞器在其外膜和内膜上都存在特异的蛋白转运子。另外,因为前体蛋白一般不是以稳定的成熟形式存在,极易被降解或形成聚合物,因此一般和辅助因子相结合以保持稳定。迄今研究得最多的辅助因子有胞质伴侣分子Hsp70和Hsp90,但是它们与前体蛋白结合和释放的具体机制还未阐释清楚(Mihara和Omura 1996; Young等2003; Kovács-Bogdán等2010)。

3.2.1 线粒体蛋白的转运 指导前体蛋白进入线粒体的信号肽是目前被研究的最多和相对最清楚的(Alberts等2007)。绝大多数线粒体定位的前体蛋白在其N端存在一段可以被剪切的信号序列,称为前导序列(presequence)或前导肽(prepeptide)。它们一般是由10~80个氨基酸组成的带有一段疏水序列和一段正电荷序列(表面)的两亲多肽螺旋。研究表明,不仅N端前导肽本身对线粒体前体蛋白的转运是必需的,其所处的位置也至关重要。将前导肽从N端转移到C端之后,虽然蛋白还可以转运至线粒体中,但是蛋白在转运时C端与N端的方向却颠倒了(Fölsch等1998)。

线粒体基质蛋白的转运是由位于外膜的TOM蛋白复合体[translocase of the outer mitochondrial membrane (TOM) complex]和位于内膜上的TIM23蛋白复合体(translocase of the inner mitochondrial membrane 23 complex)共同完成的。TOM蛋白复合体能够识别胞质中的前体蛋白并使其与伴侣分子

解离,使前体蛋白通过 TOM 复合体自身形成的通道而进入线粒体膜间隙(intermembrane space, IMS),或者介导一些外膜定位的蛋白的跨膜。它由 7 个亚基构成,其中 Tom20 亚基和 Tom70 亚基是识别前体蛋白的主要受体,并与伴侣分子 Hsp70 或者 Hsp90 相互作用,在 ATP 提供能量的前提下,使前体蛋白与伴侣分子解离并使其进入 TOM 复合体形成的跨膜通道(Young 等 2003)。核磁共振结构分析显示, Tom20 亚基的胞质面与前体蛋白相互作用处存在一个结合前导肽表面疏水结构的沟槽(Abe 等 2000),所以一般认为, Tom20 亚基是前体蛋白 N 端前导肽的主要受体。而 Tom22 亚基则辅助 Tom20 亚基与前体蛋白结合(Neupert 和 Herrmann 2007)。其他的 4 个亚基 Tom40、Tom5、Tom6 和 Tom7 组成了 TOM 复合体的跨膜通道结构。TIM23 复合体也是多由亚基组成,它转运所有的线粒体基质蛋白、大部分的内膜定位的蛋白及一些膜间隙定位的蛋白(Neupert 和 Herrmann 2007),由 TIM23 复合体介导的跨膜转运需要两种来源的能量供应——ATP 水解供能和膜两侧电位差而形成的电势能($\Delta\psi$) (Mokranjac 和 Neupert 2005)。前体蛋白通过 TOM 复合体进入线粒体膜间隙之后, TIM23

复合体通过 Tim50 亚基和 Tim23 亚基与其前导肽结合,并在能量供应的前提下使其通过内膜。由 Tim44 亚基将其呈递给基质中结合 ATP 的 mtHsp70, mtHsp70 就像 TIM23 的一个亚基结合在其靠线粒体基质的一面,而且 mtHsp70 对未折叠的蛋白有着很高的亲和力,一旦前体蛋白从 TIM23 复合体中出现在基质中时, mtHsp70 就牢牢的结合上去(Alberts 等 2007)。Tim14 亚基继而诱导 ATP 水解,导致 Hsp70 亚基与 TIM23 复合体解离。mtHsp70 的结合不仅起稳定前体蛋白的作用,还防止正在转运进基质的蛋白“缩回”膜间隙中(Neupert 和 Herrmann 2007)。一般情况下,当前体蛋白的前导肽酶切位点进入基质的时候,就会在基质信号肽酶(mitochondrial-processing peptidase, MPP)的作用下将其切除(Braun 和 Schmitz 1997; Gakh 等 2002)(图 2)。

线粒体外膜定位的蛋白都是在细胞质中合成的,包含 β -桶状蛋白和 α 螺旋蛋白两种类型。线粒体 β -桶状蛋白的前体由 TOM 复合体转运至膜间隙之后与一些小 Tim 蛋白结合,继而由另外一种位于线粒体外膜的转运子介导其跨膜定位,这个转运子被命名为 TOB (topogenesis of mitochondrial outer membrane β -barrel)复合体(Paschen 等 2003)或 SAM

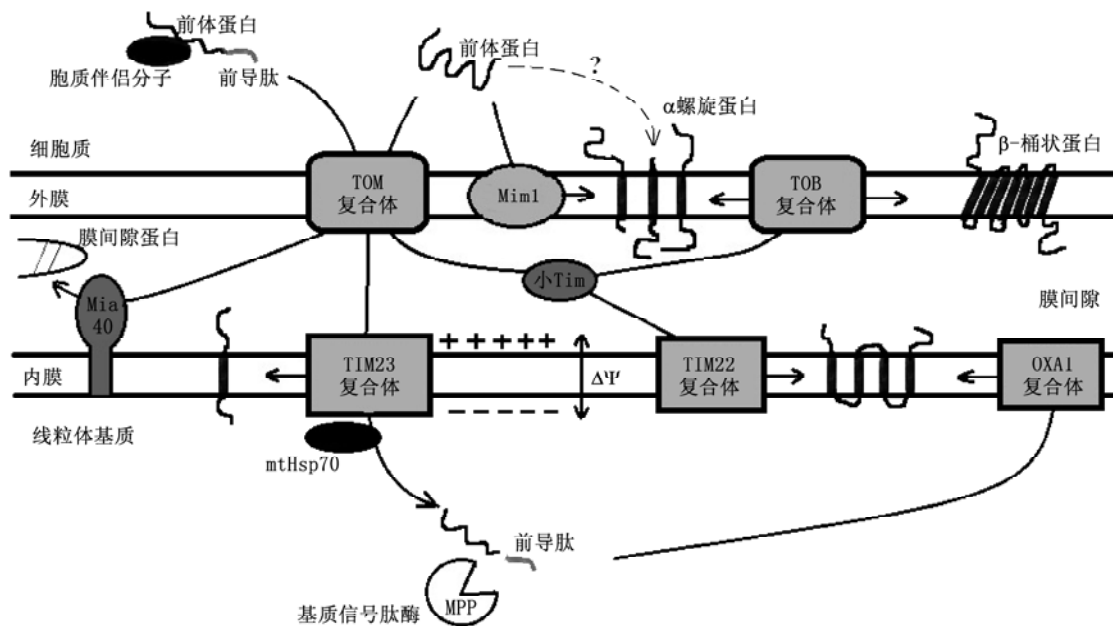


图2 核基因组编码的线粒体蛋白质转运示意图

Fig.2 A model for nuclear gene encoded-protein to tranlocate into the mitochondria

(sorting and assembly machinery)复合体(Wiedemann等 2003)(图 2)。 α 螺旋蛋白根据其定位信号序列在多肽中的位置的不同有着不同的转运机制。信号序列位于 N 末端的 α 螺旋蛋白通过 Mim1 (mitochondrial import 1)插入外膜;而有些信号序列位于中部和 C 末端的 α 螺旋蛋白则与 β - 桶状蛋白有着相同的转运机制,另一些的转运机制目前尚不了解(Schmidt 等 2010)。

线粒体内膜定位的蛋白质绝大多数来自细胞质,通过 TOM 复合体进入膜间隙后,主要以三种不同的方式定位于内膜(Neupert和Herrmann 2007)(图 2)。第一种是依赖 TIM22 的方式,即进入膜间隙的前体蛋白与小 Tim 蛋白结合并被传递给 TIM22 复合体,由 TIM22 介导其跨膜定位,这个过程依赖膜两侧的电位差。第二种被称为转移终止方式(the stop-transfer pathway),采用这种方式的多数为单次跨膜蛋白。因为在前体蛋白的中部存在能被 TIM23 复合体识别的一段疏水性序列,所以当前体蛋白在 N 端前导肽的引导下以 N \rightarrow C 的顺序进入线粒体基质时,跨膜转移就会终止,从而形成跨膜蛋白。以第三种方式跨膜的一般是一些多次跨膜蛋白,这种机制目前还不是很了解,即蛋白先被转运至基质中与 mtHsp70 结合,在内膜上的 OXA1 复合体介导下进行线粒体内膜跨膜定位。另外,线粒体膜间隙中也存在着许多具有重要功能的蛋白,它们一般没有可以被剪切的信号肽序列, MIA (mitochondrial intermembrane space assembly)复合体在这些富含半胱氨酸残基的膜间隙蛋白的定位过程中发挥了重要的作用。MIA 由 Mia40 和 Erv1 (essential for respiration and viability 1)两种组分构成。Erv1 能够通过转移二硫键给 Mia40 从而使其发生氧化,而 Mia40 能够识别通过 TOM 复合体进入膜间隙的前体蛋白中所包含的疏水序列或半胱氨酸残基等信号序列(Sideris 等 2009),并能通过形成的瞬时二硫键与其结合。Mia40 就像一个二硫键载体,通过将二硫键转移给前体蛋白从而促进其氧化形成成熟的构象(Schmidt 等 2010)。

3.2.2 叶绿体蛋白的转运 叶绿体自身的遗传信息有限,大部分的叶绿体蛋白由核基因组编码,在细胞质中合成后转运进叶绿体,拟南芥中大约有 3 000 种核基因组编码蛋白被预测为叶绿体定位(vanWijk

2004)。绝大多数叶绿体定位的前体蛋白在其 N 端含有可被剪切的信号序列:转移肽(transit peptides)。与定位于内质网的“信号肽”和定位于线粒体的“前导肽”一样,转移肽在氨基酸组成及长度等一级结构上没有明显的相似性,但一般都包含使它们具有相似功能的结构域,这些功能包括与脂膜、叶绿体受体及信号肽酶等的相互作用(Bruce 2000)。有趣的是,目前至少约 50 种蛋白质在同一信号序列的引导下既可定位于叶绿体也可定位于线粒体(Carrie 等 2009)。与线粒体相似,叶绿体中的蛋白也是在位于双层脂膜上的转运蛋白复合体的共同作用下进行正确定位的,它们分别是位于叶绿体外膜的易位子 TOC (translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts)复合体和位于叶绿体内膜的易位子 TIC (translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts)复合体。

Toc159 和 Toc34 是位于叶绿体外膜的 GTPases,且它们具有同源的 GTP 结合区域。Toc34 是最先接触待运蛋白的受体,它受 GTP 和磷酸化的调节(Sveshnikova 等 2000)。Toc159 不仅是外膜上的受体蛋白,而且在 GTP 供能的情况下作为分子马达促进前体蛋白穿过 TOC 复合体所组成的通道(Schleiff 等 2003),它由三个功能域组成: N 末端的 A 区域、C 末端与质膜结合的 M 区域及中间具有 GTPase 活性的 G 区域。与 Toc159 和 Toc34 相连的是具有 β -桶状结构的通道蛋白 Toc75。由这三种蛋白所组成的 TOC 核心复合体在体外就足以将前体蛋白转运进脂质囊泡中(Schleiff 等 2003)。此外, Toc64 和 Toc12 也被证实为 TOC 复合体的组分,它们的功能分别涉及前体蛋白的识别和将膜间隙中的伴侣分子 Hsp70 招募至 TOC 复合体处并促进其与前体蛋白的相互作用(Sohrt 和 Soll 2000; Becker 等 2004)。

目前已有 8 种 TIC 复合体的组分被鉴定,它们分别是 Tic110、Tic40、Tic20、Tic21、Tic22、Tic55、Tic62 和 Tic32。Tic110 的 N 末端作为在叶绿体基质中的受体与前体蛋白转移肽有一个紧密结合的过程,而其 C 末端或者位于整个基质侧的功能域则可以结合 Hsp93 和 Tic40。Tic20/Tic21 组成了蛋白质通过叶绿体内膜的转运通道。Tic40 和基质伴侣分子 Hsp93 作为马达复合体(motor complex)在 ATP 供能的情况下为蛋白的转入提供驱动力。

Tic55、Tic62 和 Tic32 通过其对氧化还原势敏感的基团来对蛋白质的转运进行氧化还原调节 (Kovács-Bogdán 等 2010)。此外, Toc64、Toc12、Tic22 和伴侣分子 Hsp70 所组成的“膜间隙复合体”(inter-membrane space complex) 在促进和引导前体蛋白在两个转运复合体之间的转运中发挥了重要的作用 (Becker 等 2004)。

前体蛋白与伴侣分子在胞质中结合并被转运至叶绿体表面之后, 其转移肽就被 GTP 结合态的 Toc159 所识别, 然而这种识别和向通道蛋白 Toc75 的呈递却似乎是通过 Toc34 水解 GTP 来调节的 (Li 和 Chiu 2010)。需要指出的是, 前体蛋白穿过叶绿体外膜需要胞质或者膜间隙中存在低浓度的 ATP 和 GTP (低于 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 而穿过叶绿体内膜则需要存在基质中存在高浓度的 ATP (约 $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (Jarvis 和 Soll 2001; Li 和 Chiu 2010)。当低浓度 ATP 时, 转移肽首先通过 Toc75 进入膜间隙中, 继而通过内膜上的 Tic20 复合体并与位于叶绿体基质侧的 Tic110 N 末端结合。当基质中的 ATP 足够时, 与转移肽结合的 Tic110 就会招募 Tic40 的结合, Tic40 在 Hsp93 的作用下刺激 ATP 水解, 从而将前体蛋白释放至叶绿体基质中, 并进一步接受转移肽酶 (stromal processing peptidase, SPP) 的剪切。ATP 水解后, Tic40 与 Hsp93 解离。在正常光照条件下, 当基质中的 ATP 浓度较高时, 与 Hsp93 结合的 ADP 会迅速转变为 ATP, 从而开始下一轮蛋白转运的循环 (Li 和 Chiu 2010)。

叶绿体外膜蛋白的定位主要有五种途径 (具体参见 Hofmann 和 Theg 2005), 但与线粒体类似, 所有的转运途径一般都会通过一个中心通道来进行蛋白跨膜转运 (Li 和 Chiu 2010)。研究表明, 嗜热菌蛋白酶能够消化 Toc159 和 Toc34, 但是不能消化 Toc75, 然而一些叶绿体外膜蛋白的正确定位对嗜热菌蛋白酶的处理并不敏感, 说明 Toc159 和 Toc34 没有参与这个过程。例如 PsOEP14 蛋白就可以高效的镶入只含有 Toc75 的脂蛋白体 (Tu 等 2004)。有趣的是, Toc75 本身作为一种外膜定位的蛋白, 在其 N 端和 C 端分别具有一段转移肽序列, 位于 N 端的转移肽指导 Toc75 通过 TOC/TIC 复合体转运至叶绿体基质, 并在 SPP 的作用下将其剪切, 而位于 C 端的转移肽序列阻止了 Toc75 在叶绿体基质中的

进一步转运 (Tranel 和 Keegstra 1996), 最后被质体 I 型信号肽酶 (plastid type I signal peptidase, Plsp1) 切除 (Inoue 等 2005)。

叶绿体内膜蛋白定位的第一种方式称为转移终止途径, 即转运中止在前体蛋白穿过内膜转运子的过程中, 继而插入叶绿体内膜。Arc6 及 PPT、IEP37 等就是采用这种途径进行内膜定位的 (Tripp 等 2007; Firlej-Kwoka 等 2008)。而 Tic110 和 Tic40 等采用的另外一种内膜定位方式则为后镶入 (post-import) 途径。采用这种方式定位的前体蛋白一般先通过 TOC/TIC 途径转运至叶绿体基质中, 然后再进行内膜定位 (Lübeck 等 1997; Li 和 Schnell 2006)。但是叶绿体膜间隙蛋白的具体转运机制仍不清楚, 目前研究的膜间隙定位蛋白 Tic22 与 MGD1 (monogalactosyldiacyl glycerol synthase) 都通过 TOC 复合体转运至膜间隙, 但是到达膜间隙后它们却面临不同的定位方式: MGD1 在膜间隙定位前会先转运至叶绿体基质中, 并在 SPP 的作用下切除其转移肽; 而 Tic22 并无这一过程 (Vojta 等 2007)。

3.3 蛋白质的入核转运

与其他一些采用翻译后转运机制的蛋白不同的是, 在细胞质中合成的核定位蛋白一般通过镶嵌在双层核膜上的核孔复合体 (nuclear pore complex, NPC) 进入细胞核, 而核定位信号序列 (nuclear localization signal, NLS) 在该过程中发挥了重要的作用。与一般蛋白的信号肽不同, 核定位蛋白的 NLS 几乎可以位于蛋白序列的任何部位, 而且一般情况下不被切除, 因为其参与了蛋白质行使功能的过程。

研究得最多的是依赖于核转运受体 Importin α/β 的经典蛋白质入核机制 (Gasiorowski 和 Dean 2003; 周鸣等 2006; Lange 等 2007)。首先 Importin β -RanGDP 复合体在 NPC 的胞质面与 RanBP2 结合 (图 3-A), 继而货物蛋白通过 Importin α 结合在 Importin β 和 RanBP2 上, 在 RanGTP 酶活化因子、RanBP1 和 RanGAP1 等作用下, 形成 RanGDP-Importin α -Importin β -货物蛋白的转运复合体; 转运复合体在核孔蛋白和转运因子 2 (NTF2) 等的参与下通过 NPC 进入胞核内 (图 3-B) (Ribbeck 等 1998); 在鸟苷酸交换因子 RCC1 的作用下, RanGDP 转换成 RanGTP, 使得 Importin α 和货物蛋白从上述转运复合体中解离, 完成货物蛋白的核内转运过

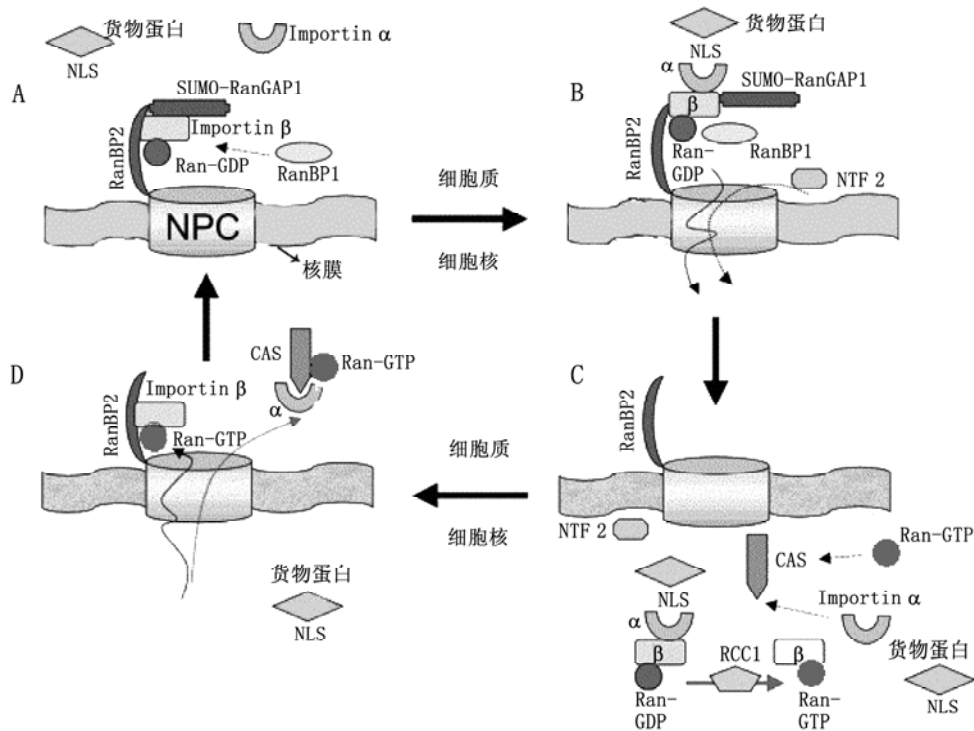


图3 蛋白质入核转运示意图(修改自 Gasiorowski 和 Dean 2003)

Fig.3 Schematic diagram of proteins transporting into the nucleus (modified from Gasiorowski and Dean 2003)

NLS: 核定位信号; NPC: 核孔复合体; NTF2: 转运因子 2; RCC1: 鸟苷酸交换因子; RanBP: Ran 结合蛋白; RanGAP: Ran GTP 酶激活蛋白。

程(图 3-C); 与货物蛋白解离后的 Importin β 仍然与 Ran-GTP 结合并被转运出核。而 Importin α 与 RanGTP 及核输出受体(nuclear export receptor, CAS)结合形成 Importin α -CAS-RanGTP 复合体运出细胞核, 在 RanBP1 及 RanGAP1 等的作用下 Importin α 从复合体重新解离释放到细胞质中进入下一轮循环(图 3-D)(Kutay 等 1997)。经典的核输入过程的能量由 Ran 提供, Ran 蛋白是小 ras 蛋白家族成员, 它有 RanGTP 和 RanGDP 两种形态(Quimby 和 Dasso 2003)。RanGTP 主要存在于细胞核中, 而 RanGDP 主要存在于细胞质中, 这种不对称分布可以使 Ran 作为一个分子开关控制货物蛋白运输的方向, 调节其与载体蛋白的结合与释放。因此, 在 RanGTP 含量较低的细胞质中, 核转运受体可以结合带有 NLS 的待运蛋白, 而在细胞核高浓度 RanGTP 的情况下释放货物蛋白(Kalab 等 2002; Smith 等 2002)。

4 展望

信号肽的研究具有重要理论意义, 但是在应用

领域的研究前景更为广阔。目前的趋势是在进一步阐明信号肽作用机制的基础上, 利用这些已经鉴定或潜在的信号肽序列进行定向的生物工程改造, 使目的蛋白定位至特定的亚细胞部位发挥相应功能。

研究最多的是在酵母表达系统中应用信号肽以增加目的蛋白的分泌特性。主要从两个方面进行改造, 一方面在蛋白的氨基端接入一个分泌蛋白的信号肽以使其分泌表达。常用的酵母内源性信号肽有 α 因子信号肽(mating factor $\alpha 1$, MF $\alpha 1$)、酸性磷酸酯酶(phosphatase 1, PHO1)和蔗糖酶(sucrase 2, SUC2)等, 其中以 α 因子的信号肽应用最广, 特别对一些小分子量蛋白的分泌尤为有效。小鼠表皮生长因子与酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) α 因子信号肽融合后得到更高效的分泌表达等都是很好的例证(Clare 等 1991)。另一方面是改变一些分泌效率不高的分泌蛋白的信号肽序列使其更高效的表达。如将 α 因子信号肽与胰岛素前体基因之间插入一段序列, 发酵后胰岛素前体表达量比插入

前的表达量提高了2~3倍(Kjeldsen等1999;王燕等1999)。而在利用核定位信号序列(NLS)方面的研究则主要集中在转基因上的应用,如将NLS-DNA结合复合物胞质注射,提高了DNA的核吸收从而增加了转基因的效率(Collas和Alestrom1997)。在植物中的应用研究目前虽然少见报道,但是其应用前景也是很广阔的。例如利用“信号假说”的原理将特定的离子转运通道蛋白定位到植物细胞的特定部位,使植物的离子吸收及转运发生定向的改变,这对植物的营养吸收、抗逆及利用植物进行环境修复等都具有重要的意义。

参考文献

- 王燕,梁镇和,张友尚,崔大敷,冯佑民(1999).人胰岛素在甲醇酵母 *Pichia storeri* 中的分泌表达.生物化学与生物物理学报, 31 (5): 587~589
- 韦雪芳,王冬梅,刘思,周鹏(2006).信号肽及其在蛋白质表达中的应用.生物技术通报, 6: 39~42
- 周鸣,李小玲,李桂源(2006).蛋白质入核转运的机制和研究进展.中国生物化学与分子生物学报, 22 (10): 780~786
- Abe Y, Shodai T, Muto T, Mihara K, Torii H, Nishikawa S, Endo T, Kohda D (2000). Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell*, 100 (5): 551~560
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2007). *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 713~718
- Becker T, Hritz J, Vogel M, Caliebe A, Bukau B, Soll J, Schleiff E (2004). Toc12, a novel subunit of the intermembrane space preprotein translocon of chloroplasts. *Mol Biol Cell*, 15 (11): 5130~5144
- Blobel G, Dobberstein B (1975). Transfer of proteins across membranes I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol*, 67 (3): 835~851
- Blobel G, Sabatini DD (1971). Ribosome-membrane interaction in eukaryotic cells. In: Manson LA (ed). *Biomembranes*. New York: Plenum Publishing Corporation, 2: 193~195
- Braun HP, Schmitz UK (1997). The mitochondrial processing peptidase. *Int J Biochem Cell Biol*, 29 (8-9): 1043~1045
- Bruce BD (2000). Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends Cell Biol*, 10 (10): 440~447
- Carrie C, Giraud E, Whelan J (2009). Protein transport in organelles: dual targeting of proteins to mitochondria and chloroplasts. *FEBS J*, 276 (5): 1187~1195
- Clare JJ, Romanos MA, Rayment FB, Rowedder JE, Smith MA, Payne MM, Sreekrishna K, Henwood CA (1991). Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene*, 105 (2): 205~212
- Collas P, Alestrom P (1997). Nuclear localization signals: a driving force for nuclear transport of plasmid DNA in zebrafish. *Biochem Cell Biol*, 75 (5): 633~640
- Connolly T, Rapiejko P, Gilmore R (1991). Requirement of GTP hydrolysis for dissociation of the signal recognition particle from its receptor. *Science*, 252 (5009): 1171~1173
- Firlej-Kwoka E, Strittmatter P, Soll J, Bölter B (2008). Import of preproteins into the chloroplast inner envelope membrane. *Plant Mol Biol*, 68 (4-5): 505~519
- Fölsch H, Gaume B, Brunner M, Neupert W, Stuart RA (1998). C- to N-terminal translocation of preproteins into mitochondria. *EMBO J*, 17 (22): 6508~6515
- Gakh O, Cavadini P, Isaya G (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta*, 1592 (1): 63~77
- Gasiorowski JZ, Dean DA (2003). Mechanisms of nuclear transport and interventions. *Adv Drug Deliver Rev*, 55 (6): 703~716
- Gilmore R, Walter P, Blobel G (1982). Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol*, 95 (2): 470~477
- Halic M, Beckmann R (2005). The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Curr Opin Struct Biol*, 15 (1): 116~125
- Heemels MT (1999). Medicine Nobel goes to pioneer of protein guidance mechanisms. *Nature*, 401 (6754): 625
- Hofmann NR, Theg SM (2005). Chloroplast outer membrane protein targeting and insertion. *Trends Plant Sci*, 10 (9): 450~457
- Huber D, Boyd D, Xia Y, Olma MH, Gerstein M, Beckwith J (2005). Use of thioredoxin as a reporter to identify a subset of *Escherichia coli* signal sequences that promote signal recognition particle-dependent translocation. *J Bacteriol*, 187 (9): 2983~2991
- Inoue K, Baldwin AJ, Shipman RL, Matsui K, Theg SM, Ohme-Takagi M (2005). Complete maturation of the plastid protein translocation channel requires a type I signal peptidase. *J Cell Biol*, 171 (3): 425~430
- Jarvis P, Soll J (2001). Toc, Tic, and chloroplast protein import. *Biochim Biophys Acta*, 1541 (1-2): 64~79
- Jolliffe NA, Craddock CP, Frigerio L (2005). Pathways for protein transport to seed storage vacuoles. *Biochem Soc Trans*, 33 (5): 1016~1018
- Kalab P, Weis K, Heald R (2002). Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science*, 295 (5564): 2452~2456
- Kjeldsen T, Pettersson AF, Hach M (1999). Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Appl Biochem*, 29 (1): 79~86
- Kovács-Bogdán E, Soll J, Bölter B (2010). Protein import into chloroplasts: the Tic complex and its regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1803 (6): 740~747
- Kutay U, Bischoff FR, Kostka S, Kraft R, Görlich D (1997). Export

- of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell*, 90 (6): 1061~1071
- Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE, Corbett AH (2007). Classical nuclear localization signals: definition, function and interaction with importin alpha. *J Biol Chem*, 282 (8): 5101~5105
- Li HM, Chiu CC (2010). Protein transport into chloroplasts. *Annu Rev Plant Biol*, 61: 157~180
- Li M, Schnell DJ (2006). Reconstitution of protein targeting to the inner envelope membrane of chloroplasts. *J Cell Biol*, 175 (2): 249~259
- Lübeck J, Heins L, Soll J (1997). A nuclear-coded chloroplastic inner envelope membrane protein uses a soluble sorting intermediate upon import into the organelle. *J Cell Biol*, 137 (6): 1279~1286
- Luirink J, Sinning I (2004). SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim Biophys Acta*, 1694 (1-3): 17~35
- Martoglio B, Dobberstein B (1998). Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol*, 8 (10): 410~415
- Martoglio B, Graf R, Dobberstein B (1997). Signal peptide fragments of preprolactin and HIV-1 p-gp160 interact with calmodulin. *EMBO J*, 16 (22): 6636~6645
- Mihara K, Omura T (1996). Cytoplasmic chaperones in precursor targeting to mitochondria: the role of MSF and hsp70. *Trends Cell Biol*, 6 (3): 104~108
- Mokranjac D, Neupert W (2005). Protein import into mitochondria. *Biochemical Soc T*, 33 (5): 1019~1023
- Mothes W, Heinrich SU, Graf R, Nilsson I, von Heijne G, Brunner J, Rapoport TA (1997). Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell*, 89 (4): 523~533
- Neupert W, Herrmann JM (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 76: 723~749
- Paschen SA, Waizenegger T, Stan T, Preuss M, Cyrklaff M, Hell K, Rapoport D, Neupert W (2003). Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature*, 426 (6968): 862~866
- Quimby BB, Dasso M (2003). The small GTPase Ran: interpreting the signs. *Curr Opin Cell Biol*, 15 (3): 338~344
- Rapoport TA (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, 450 (7170): 663~669
- Ribbeck K, Lipowsky G, Kent HM, Stewart M, Görlich D (1998). NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J*, 17 (22): 6587~6598
- Schleiff E, Jelic M, Soll J (2003). A GTP-driven motor moves proteins across the outer envelope of chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci*, 100 (8): 4604~4609
- Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C (2010). Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11 (9): 655~667
- Sideris DP, Petrakis N, Katrakili N, Mikropoulou D, Gallo A, Ciofi-Baffoni S, Banci L, Bertini I, Tokatlidis K (2009). A novel intermembrane space-targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding. *J Cell Biol*, 187 (7): 1007~1022
- Smith AE, Slepchenko BM, Schaff JC, Loew LM, Macara IG (2002). Systems analysis of Ran transport. *Science*, 295 (5554): 488~491
- Sohrt K, Soll J (2000). Toc64, a new component of the protein translocator of chloroplasts. *J Cell Biol*, 148 (6): 1213~1221
- Sveshnikova N, Soll J, Schleiff E (2000). Toc34 is a preprotein receptor regulated by GTP and phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci*, 97 (9): 4973~4978
- Tranel PJ, Keegstra K (1996). A novel, bipartite transit peptide targets OEP75 to the outer membrane of the chloroplastic envelope. *Plant Cell*, 8 (11): 2093~2104
- Tripp J, Inoue K, Keegstra K, Froehlich JE (2007). A novel serine/proline-rich domain in combination with a transmembrane domain is required for the insertion of AtTic40 into the inner envelope membrane of chloroplasts. *Plant J*, 52 (5): 824~838
- Tu SL, Chen LJ, Smith MD, Su YS, Schnell DJ, Li HM (2004). Import pathways of chloroplast interior proteins and the outer-membrane protein OEP14 converge at Toc75. *Plant Cell*, 16 (8): 2078~2088
- vanWijk KJ (2004). Plastid proteomics. *Plant Physiol Biochem*, 42 (12): 963~977
- Vitale A, Hinz G (2005). Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms? *Trends Plant Sci*, 10 (7): 316~323
- Vojta L, Soll J, Bölder B (2007). Protein transport in chloroplasts - targeting to the intermembrane space. *FEBS J*, 274 (19): 5043~5054
- von Heijne G (1985). Signal sequences, the limits of variation. *J Mol Biol*, 184 (1): 99~105
- von Heijne G (1986). Towards a comparative anatomy of N-terminal topogenic protein sequences. *J Mol Biol*, 189 (1): 239~242
- von Heijne G (1990). The signal peptide. *J Membr Biol*, 115 (3): 95~201
- von Heijne G (1998). Life and death of a signal peptide. *Nature*, 396 (6707): 111~112
- Walter P, Blobel G (1980). Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci*, 77 (12): 7112~7116
- Walter P, Lingappa VR (1986). Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol*, 2: 499~516
- Wiedemann N, Kozjak V, Chacinska A, Schönfisch B, Rospert S, Ryan MT, Pfanner N, Meisinger C (2003). Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature*, 424 (6948): 565~571
- Young JC, Hoogenraad NJ, Hartl FU (2003). Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell*, 112 (1): 41~50