

文章编号: 1004-0374(2010)03-0232-05

动物细胞的基因转录调控: 来自生化研究的启示

Robert G. Roeder

(美国洛克菲勒大学)

摘要: 在真核细胞中, 转录调控可以发生在多个层面, 包括结构和功能迥异的 RNA 聚合酶、对应的广谱起始因子、基因特异性调控因子(DNA 结合蛋白)以及各种共调节因子(coregulatory factors)。这些共调节因子可以通过染色质修饰, 如组蛋白乙酰化和甲基化, 或更直接地促进转录起始复合物的形成。通过一系列体外转录活性实验的研究, 转录相关的酶、蛋白因子的性质和功能以及作用机制正逐步被揭示出来。该文将具体阐述近几十年科学家们在转录共调节因子方面取得的进展。

关键词: 转录调控; 共调节因子; 转录中介体; 组蛋白修饰

中图分类号: Q754 **文献标识码:** A

Transcriptional regulatory mechanisms in animal cells: insights from biochemical studies

Robert G. Roeder

(Rockefeller University, New York, USA)

Abstract: In eukaryotes, transcriptional regulation happens in multiple levels, involving different nuclear RNA polymerases, corresponding general initiation factors, gene-specific regulatory factors, and a variety of coregulatory factors that act either through chromatin modifications (e.g. histone acetyltransferases and methyltransferases) or mediators to facilitate the formation and function of the preinitiation complex. Biochemical studies have provided insights into the mechanism of action of these factors, including pathways for their sequential function in chromatin remodeling and preinitiation complex formation/function steps.

Key words: transcriptional activators; coactivators; mediator; histone modifications

1 概述

真核生物的基因组异常复杂(如人类的基因超过 25 000 个), 却高度有序地被组织成致密的核蛋白质(染色体)结构。因此, 研究各个基因的转录激活机制具有重要的生理意义。在过去的 40 年里, 一系列的研究已经揭示了转录调控的多个水平^[1] (图1)。

首先, 真核生物包含三类功能截然不同的 RNA 聚合酶^[2], 它们能够选择性地转录编码核糖体 RNA 的基因(RNA 聚合酶 I)、编码蛋白质和少量结构 RNA 的基因(RNA 聚合酶 II)和编码 tRNA、5S RNA 及其他小 RNA 的基因(RNA 聚合酶 III)^[3, 4]。它们的这些特异性是通过结构特异的组分来实现的^[5]。

其次, 各个 RNA 聚合酶都对应有特异性的起始因子, 它们对转录起始必不可少, 其中, RNA 聚合酶 I 有 14 个亚基; RNA 聚合酶 II 有 12 个亚基; RNA 聚合酶 III 有 17 个亚基^[6, 7]。现在人们已经知道, TFIIE、TFIIF 和 TFIIH 对应 RNA 聚合酶 I; TFIIA、TFIIB 和 TFIIID 对应 RNA 聚合酶 II; TFIIC 和 TFIIB 对应 RNA 聚合酶 III。以 RNA 聚合酶 II 为例, 包含 RNA 聚合酶 II 的转录起始复合物就包含了至少 44 个蛋白质。一系列的遗传学及生物化学研究正逐步揭示各个蛋白质在转录起始过程中的作用。既然 RNA 聚合酶和起始因子是各个调控蛋白的最终靶标, 那么这些复合物便提供了多个调控

点。从这种意义上说, 尽管纯化的 RNA 聚合酶及其相关因子在体外能够准确地转录 DNA 模板, 但在体内, 这种转录活性会受到核小体结构及其他抑制因子的限制, 这就要求转录激活因子以一种基因特异性的方式逆转转录抑制效应。

第三, 真核生物在基因组的不同位置包含了各种序列特异性的转录调控因子, 促进特定基因的 RNA 聚合酶活性。5S 基因特异性的 TRIIIIA 是第一个被鉴定出来的序列特异性转录调控因子^[8, 9], 而截至目前, 已经有超过 2 500 个类似的转录因子被鉴定出来。

第四, 这些特异性的转录因子需要与一类辅因子一起促进转录起始复合物。这些辅因子在转录起始过程中可能扮演着更加直接的作用。这些辅因子为转录起始提供了又一层面的调控机制, 也增加了转录调节的复杂性。

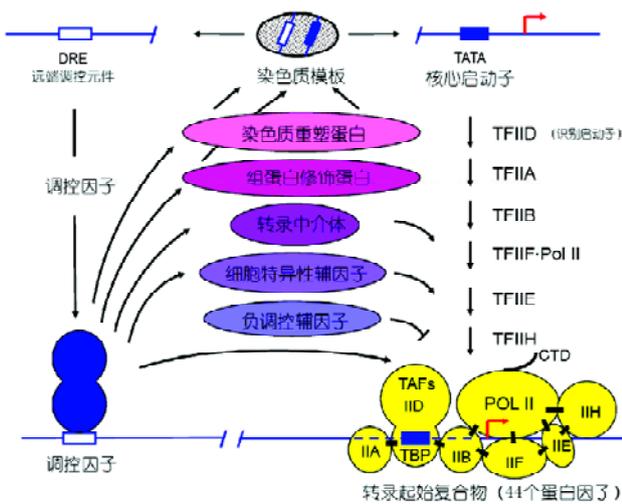


图1 广谱的转录起始因子及起始复合物组装通路

转录起始复合物的组装包括 RNA 聚合酶 II 和其他相关起始因子(黄色), 它们通过 TFIID 被聚集并结合到启动子区。经典的转录起始复合物组装的调控模型包括了一系列顺序事件: (1) 调控蛋白结合到远端控制元件区; (2) 调控蛋白招募染色质修饰/重塑蛋白改变核小体的构象以促进其他组分的招募; (3) 调控蛋白通过相互作用招募其他辅因子, 从而直接促进转录机器的招募。

2 转录中介复合物

早期对激活子的研究发现, 在体外重构的系统中, RNA 聚合酶 II 以及相关蛋白对于激活子依赖性的转录需要额外的一种辅因子, 而本底水平的转录则不需要辅因子。在人类细胞中, 这种具有上游刺激活性(upstream stimulatory activity, USA)的辅因

子被发现是由一组负调节因子和正调节因子组成的, 它们共同或选择性地抑制本底转录, 并促进激活子依赖的转录活性^[10]。这其中的一组正调控因子此后被鉴定为人的转录中介复合物(图2)。人转录中介复合物是酵母转录中介复合物的对应物。后者最早是作为一组 RNA 聚合酶 II 结合蛋白被鉴定出来的, 并被发现包含了许多转录激活子。最近的研究已经揭示了转录中介复合物从酵母到人类的高度保守性。

人转录中介复合物最早是作为甲状腺激素受体的相互作用蛋白(thyroid hormone receptor associated proteins, TRAP)被鉴定出来的^[11]。这组甲状腺激素受体相互作用蛋白对于甲状腺受体依赖性的转录必不可少。其中, 相对分子质量为 220 k 的 TRAP220/Med1 亚基被发现是一个广谱的核受体相互作用蛋白, 负责 TRAP 复合物与受体之间的桥联。TRAP220 的 LXXLL 结构域被发现对 TRAP220 与核受体的相互作用至关重要。TRAP220 缺失细胞的研究证实了它在核受体发挥功能方面的生理意义^[12]。这一系列的研究显示, 转录中介复合物的作用首先要通过与特异性的转录激活因子相互作用。

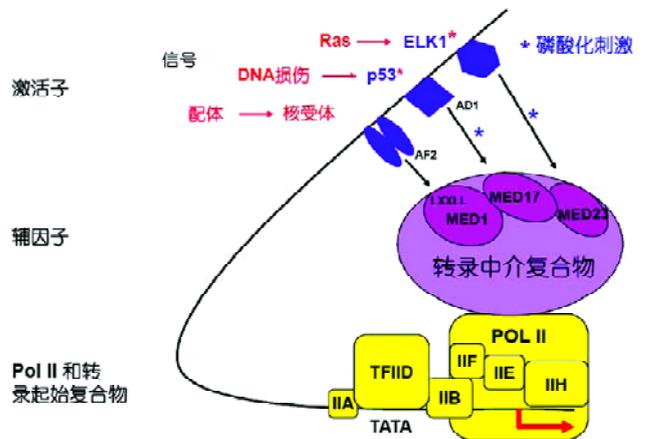


图2 转录中介复合物

外界信号刺激细胞, 转录因子被激活从而与转录中介复合物的相应亚基发生相互作用。转录中介复合物再招募转录起始复合物, 从而发挥转录激活的效应。

TRAP 复合物被鉴定出来之后, 人的转录中介复合物被最终分离出来。这些研究又提供了进一步的证据支持转录中间体对激活子功能的普遍贡献。除了上述的 MED1, Elk-1 和 E1-A 相互作用蛋白 Med23/Sur2 亚基的缺失会导致 Elk-1 和 E1-A 的功能选择性丧失^[13]。体外生化实验结果还显示, p53 能

特异性与 TRAP80/MED17 相互作用。促有丝分裂素能够特异性增强 E1k-1 与转录中介复合物的相互作用, 而 DNA 损伤引起的 p53 磷酸化能够增加 p53 与转录中介复合物的相互作用。可以预想, 许多增加激活子效应或调节因子活性的信号通路很可能都是通过转录中介复合物来实现的。

结合于激活子的转录中介复合物如何促进转录起始复合物的形成与作用目前仍是一个疑问。最近, 在酵母和人类中分离纯化到转录中介复合物 - RNA 聚合酶 II 的复合物, 这暗示转录中介复合物可能可以促进 RNA 聚合酶 II 的招募。体外实验显示, 在转录起始后, 转录中介复合物仍结合在启动子区, 因此可以继续促进下一轮的 RNA 聚合酶 II 作用。进一步的实验证明, 尽管激活子招募了整个转录中介复合物, 转录起始后, 继续保留在启动子区的只有 PC2 亚复合物。事实上, 只有缺乏 SRB8-11 亚基的转录中介亚复合物才能保持与 RNA 聚合酶 II 的稳定作用^[14]。

前不久, Roeder 等又在人类组织中分离得到一个新的高丰度的 RNA 聚合酶 II 亚群。与经典的 RNA 聚合酶 II 复合物不同的是, 这个亚群还包含了一个 Gdown1 蛋白。体外的实验显示, 没有 Gdown1 蛋白的 RNA 聚合酶 II 复合物的转录活性不依赖于转录中介复合物; 相反, 包含有 Gdown1 蛋白的 RNA 聚合酶 II 复合物在没有转录中介复合物存在的情况下没有转录活性。Gdown1 本身似乎具有抑制转录的活性, 而这种抑制效应却能够特异性的被转录中介复合物所逆转。因此可以说, Gdown1 赋予了 RNA 聚合酶 II 复合物相应转录中介复合物的特性。Gdown1 以及其他类似的蛋白提供了转录中介复合物新的转录调控机制。

3 染色质修饰与重塑

遗传物质 DNA 需要被保护、包装, 并通过各种方式调控它的一系列代谢过程, 包括转录、复制和修复。在真核生物中, 一组高度保守的小蛋白——组蛋白在其中发挥着关键性的作用^[15]。双拷贝的组蛋白 H2A、H2B、H3、H4 组成的八聚体与其上缠绕 7/4 圈的 147 个碱基对构成核小体核心, 再与组蛋白 H1 间隔构成核小体, 串珠状的核小体反复盘绕折叠构成染色质^[16, 17]。组蛋白的球状结构域作为核小体的核心构架, 而 N 端则暴露在外。为了实现对各种 DNA 代谢过程的调控, 组蛋白, 尤其是它游离的 N 端, 经历了一系列翻译后修饰, 包

括乙酰化(K-ac)、精氨酸/赖氨酸甲基化(K-me1、K-me2、K-me3、R-me1、R-me2a、R-me2s)、泛素化(K-ub)、磷酸化(S-ph、T-ph)、SUMO 化(K-su)、ADP 核糖基化(E-ar)、脯氨酸化(R > Cit)、脯氨酸二聚化(P-cis > P-trans)等等^[18]。

核小体结构为真核生物的转录提供了一道天然的屏障。事实上, 通常的转录机器只能转录没有核小体结构的 DNA 模板。因此, 早期体外实验显示, 将 DNA 包装成核小体结构能够有效抑制纯化的 RNA 聚合酶复合物的转录活性。在酵母中进行的组蛋白去除实验也证明了组蛋白的抑制活性, 进一步的研究还发现有一些蛋白能够消除组蛋白介导的抑制效应, 这种抑制效应不一定依赖于组蛋白的剔除^[19-21]。现在人们已经知道, 正是一系列的组蛋白修饰发挥着转录调节的作用。其中组蛋白乙酰化和甲基化的作用尤为重要。例如, 在早些年被遗传学方法鉴定到的转录激活因子 GCN5 现在已经用生化的方法证明是组蛋白 H3 乙酰化酶, 转录抑制因子 RPD3^[22] 被证明是组蛋白去乙酰化酶^[23, 24]。最近十几年的研究已经积累了大量的数据证明上述的各种组蛋白修饰酶发挥着转录激活或抑制的作用。值得一提的是, 大多数的情况下, 这些组蛋白修饰只是在遗传学上与转录调控事件存在相关性, 但并没有直接证据证明这些修饰是调控的诱因。这一点非常重要, 因为至少在多细胞生物体内, 许多转录调控因子是组蛋白修饰酶的底物, 如 p53 蛋白。

利用体外纯化的组蛋白、组蛋白修饰酶以及相关辅助蛋白, Roeder 实验室在体外建立了核小体修饰体系, 该体系最初被用来检验组蛋白及组蛋白修饰对转录的影响^[25, 26]。与最初的预想一致, 单纯的核小体结构能有效地抑制转录的进行, 无论是本底转录还是激活子依赖的转录。进一步的实验发现, 剔除组蛋白 N 末端的核小体依然保持转录抑制的活性。可见, 组蛋白的 N 端对转录抑制没有直接贡献。这个结果非常令人欣喜, 因为早先的其他课题组的发现认为组蛋白 N 端对于转录抑制必不可少。清晰地体外转录实验强有力地驳斥了这一在体内发现的假象, 并证实, 核小体的转录抑制活性只依赖于核小体的内部结构。紧接着, 利用体外重组的染色质模板来研究组蛋白 N 端缺失对 p300 依赖性的转录激活的影响。结果显示, H2A 和 H2B 的 N 端对于转录激活是可有可无的; 相反, H3 和 H4 的 N 端则都必不可少。可见, 组蛋白 H3 和 H4 的 N 端对于 p300 依赖性的转录激活有着非冗余性的关键作

用。进一步的实验突变了组蛋白 H3 或 H4 的潜在乙酰化位点, 结果导致了转录活性的丧失。因此, H3 和 H4 的乙酰化在转录激活过程中发挥着至关重要的作用。Roeder 实验室的这些发现与其他实验室发现的 p300 是组蛋白 H3 和 H4 乙酰化酶这一结果不谋而合^[26]。

同样是利用重组的染色质模板实验, Roeder 实验室最近的研究显示, p53 依赖的转录激活需要 p300 介导的组蛋白 H3 和 H4 乙酰化事件、蛋白质精氨酸甲基化酶 PRMT1 和伴随的组蛋白 H4 甲基化事件, 或者 PRMT4/CARM1 和伴随的组蛋白 H3 甲基化事件^[26]。这些研究不仅揭示了组蛋白修饰对于转录调控的重要作用, 同时也理清了各个事件之间的顺序关系。DNA 损伤反应的靶基因区, 这些转录激活子和组蛋白修饰会随之增高。这项研究有几点需要强调一下, 首先, 它提供了第一个证据支持组蛋白修饰本身, 而不是其他转录因子的修饰, 参与了转录激活子的作用; 其次, 体内的实验无法排除间接效应, 相比之下, 体外实验的结果证实组蛋白乙酰化及其他转录因子的作用是直接效应; 第三, 这提供了一个平台来研究其他组蛋白修饰对转录的影响。基于过去的研究, Bromo 结构域包含蛋白质是乙酰化组蛋白的结合蛋白质; Chromo 结构域包含蛋白质是甲基化组蛋白的结合蛋白质, 可以预测, 这些修饰的组蛋白提供了其他染色质重塑蛋白质或转录起始关键蛋白质的靶定位点。

4 从染色质修饰/重塑到转录中介复合物的过渡

以染色质为模板的一系列体外实验提出了一个

普遍模型, 激活子依赖性的染色质修饰或重塑复合物的招募能够促进转录起始复合物的形成。这里面还有一个重要问题, 那就是如何从染色质修饰/重塑步骤过渡到激活子依赖的转录起始复合物形成的步骤。这种过渡可能是一种平衡状态, 因为染色质修饰/重塑蛋白和转录中介复合物都结合在启动子区, 而开始时转录中介复合物可能是处于失活状态, 这种状态一直保持到染色质修饰/重塑蛋白改变染色质的结构进而促进转录中介复合物的作用和转录起始复合物的形成。

另一个有趣的发现是有一些辅因子能够同时与染色质重塑/修饰复合物和转录中介复合物相互作用, 其中之一就是 PGC-1 蛋白。PGC-1 是一个可诱导的共刺激因子, 它能够与核受体相互作用, 在核受体依赖的转录激活过程中能够结合并刺激 p300 和转录中介复合物的活性^[27] (图 3)。在体外实验中, PGC-1 对于转录中介复合物的促进作用 (裸 DNA) 已经得到证实, PGC-1 这一功能的发挥需要其 N 末端区域。然而, PGC-1 对 p300 的促进作用 (染色质模板) 同时需要其 N 端和 C 端, 而且该 N 端区域与和转录中介复合物的结合区域重叠, 这暗示 PGC-1 对 p300 的作用可能与转录中介复合物有关。PGC-1 还与其他许多蛋白作用, 包括 PRAR 和 TRAP220, 可见 PGC-1 很可能可以促进从染色质修饰/重塑到转录中介复合物的过渡。于是我们就可以想象, 与不同复合物的不同组分发生动态相互作用的蛋白质可能既可以稳定不同复合物, 又可以通过一种中间物的状态促进两者间的转换。通过生化

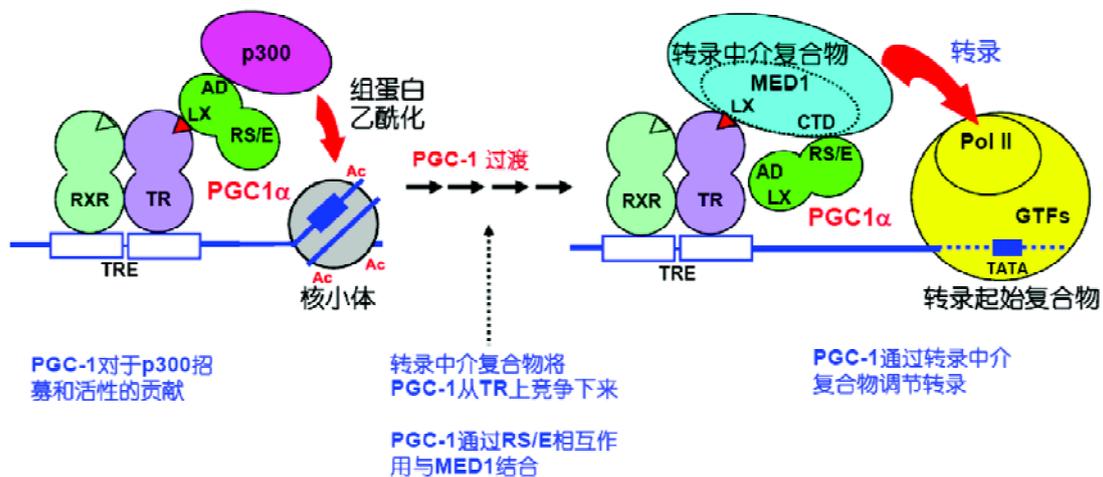


图3 PGC-1在组蛋白修饰和转录中介复合物中的多重功能

的方法, 我们可以鉴定到更多类似的蛋白质。

5 小结

自从 40 年前三种 RNA 聚合酶被发现以来, 生化研究已经鉴定到可观的转录复合物以及相关的调控复合物。这些调控复合物能够促进转录复合物结合到相应的靶基因上。这种复杂的调控体系使得各条基因激活的通路受到良好的管理, 各种生物学进程, 包括发育、细胞分化和维持也能得以正常进行。笼统而言, 这种复杂的调控至少发挥了五个方面的功能: (1) 控制各类主要的 RNA; (2) 激活或抑制包装于染色体内的基因; (3) 为 DNA 结合的调控蛋白提供多个靶点; (4) 整合多条信号通路; (5) 作为可选的或冗余的基因激活或抑制通路来促进生物的健康^[28]。

Roeder 实验室的一系列生化实验的探索, 揭示了各种转录机器及相关蛋白的作用机制, 尤其最近建立的体外以染色质为底物的转录体系, 更是大大促进了我们对转录中各个复合物、各个事件的理解。将来, 这些技术会继续为我们描绘更详细的真核生物转录蓝图。

[参 考 文 献]

- [1] Roeder RG. The eukaryotic transcriptional machinery: complexities and mechanisms unforeseen. *Nat Med*, 2003, 9 (10): 1239-44
- [2] Roeder RG, Rutter WJ. Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature*, 1969, 224 (5216): 234-7
- [3] Weinmann R, Raskas HJ, Roeder RG. Role of DNA-dependent RNA polymerases II and III in transcription of the adenovirus genome late in productive infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71 (9): 3426-39
- [4] Weinmann R, Roeder RG. Role of DNA-dependent RNA polymerase 3 in the transcription of the tRNA and 5S RNA genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71 (5): 1790-4
- [5] Sklar VE, Schwartz LB, Roeder RG. Distinct molecular structures of nuclear class I, II, and III DNA-dependent RNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, 72 (1): 348-52
- [6] Parker CS, Roeder RG. Selective and accurate transcription of the *Xenopus laevis* 5S RNA genes in isolated chromatin by purified RNA polymerase III. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74 (1): 44-8
- [7] Ng SY, Parker CS, Roeder RG. Transcription of cloned *Xenopus* 5S RNA genes by *X. laevis* RNA polymerase III in reconstituted systems. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76 (1): 136-40
- [8] Engelke DR, Ng SY, Shastry BS, et al. Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes. *Cell*, 1980, 19 (3): 717-28
- [9] Ginsberg AM, King BO, Roeder RG. *Xenopus* 5S gene transcription factor, TFIIIA: characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development. *Cell*, 1984, 39 (3 Pt 2): 479-89
- [10] Meisterernst M, Roy AL, Lieu HM, et al. Activation of class II gene transcription by regulatory factors is potentiated by a novel activity. *Cell*, 1991, 66 (5): 981-93
- [11] Fondell JD, Ge H, Roeder RG. Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93 (16): 8329-33
- [12] Ito M, Yuan CX, Okano HJ, et al. Involvement of the TRAP220 component of the TRAP/SMCC coactivator complex in embryonic development and thyroid hormone action. *Mol Cell*, 2000, 5 (4): 683-93
- [13] Stevens JL, Cantin GT, Wang G, et al. Transcription control by E1A and MAP kinase pathway via Sur2 mediator subunit. *Science*, 2002, 296 (5568): 755-8
- [14] Samuelsen CO, Baraznenok V, Khorosjutina O, et al. TRAP230/ARC240 and TRAP240/ARC250 mediator subunits are functionally conserved through evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (11): 6422-7
- [15] Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*, 2001, 293 (5532): 1074-80
- [16] Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*, 1974, 184 (139): 868-71
- [17] Kornberg, RD, Thomas JO. Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science*, 1974, 184 (139): 865-8
- [18] Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 2007, 128 (4): 693-705
- [19] Knezetic JA, Luse DS. The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II *in vitro*. *Cell*, 1986, 45 (1): 95-104
- [20] Lorch Y, LaPointe JW, Kornberg RD. Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell*, 1987, 49 (2): 203-10
- [21] Han M, Grunstein M. Nucleosome loss activates yeast downstream promoters *in vivo*. *Cell*, 1988, 55 (6): 1137-45
- [22] Gu W, Roeder RG. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, 1997, 90 (4): 595-606
- [23] Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, et al. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*, 1996, 84 (6): 843-51
- [24] Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*, 1996, 272 (5260): 408-11
- [25] An W, Palhan VB, Karymov MA, et al. Selective requirements for histone H3 and H4 N termini in p300-dependent transcriptional activation from chromatin. *Mol Cell*, 2002, 9 (4): 811-21
- [26] An W, Kim J, Roeder RG. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell*, 2004, 117 (6): 735-48
- [27] Wallberg AE, Yamamura S, Malik S, et al. Coordination of p300-mediated chromatin remodeling and TRAP/mediator function through coactivator PGC-1 α . *Mol Cell*, 2003, 12 (5): 1137-49
- [28] Kitano H. Biological robustness. *Nat Rev Genet*, 2004, 5 (11): 826-37

(中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所 周 波 编译)