

## 蛋白激酶:一个飞速发展的领域

巩学千 陈受宜

(中国科学院遗传研究所植物生物技术开放实验室)

**摘要:**近年来,蛋白激酶(Protein Kinase)的研究取得了飞速的进展,这主要是因为分子生物学技术的不断完善以及我们对蛋白激酶的了解不断加深。发现的蛋白激酶的数量爆炸般增长,这不仅仅表现在对人、动物以及酵母的研究上,对于植物蛋白激酶的了解也在深入。蛋白激酶的作用几乎无处不在。它的研究处于生命科学领域的重要位置。

自从 1959 年 Krebs 和 Fischer 纯化了第一个蛋白激酶—磷酸化酶激酶以来,人们对蛋白激酶的认识不断向深度和广度发展,先是 1968 年发现了依赖 cAMP 的蛋白激酶,随后, Nishizuka 等人于 1977 年发现了作用更广泛的蛋白激酶 C。1979 年纯化了第一个酪氨酸蛋白激酶—PP60<sup>v-src</sup>, 进入 80 年代以后,发现及提纯的蛋白激酶的数量呈直线上升,它的作用几乎无处不在,1992 年 Krebs 和 Fischer 分享了诺贝尔医学奖,以此肯定了蛋白激酶的研究工作在生命科学领域中的重要地位。

蛋白激酶研究的飞速发展即使是该领域的专家也始料不及, Tony Hunter 曾在 1987 年预测哺乳动物的蛋白激酶大约有 1000 个,而时隔 7 年,他本人即将此数目翻了一番:仅在人类中就有约 2000 个蛋白激酶基因,这样的高速度要归功于分子生物学技术的不断成熟与完善,最初采用的经典生物化学的方法,包括:离子交换层析、等电聚焦、凝胶过滤等技术,由于它们的局限性,因而在一定程度上制约了研究工作的深入,随着对蛋白激酶的了解不断加深,发现绝大多数的蛋白激酶的催化区长约 250—300 个氨基酸,分为 11 个亚区,不同类型的蛋白激酶的区别主要集中在 VI、VIII、IX 区,例如:第 VI 区丝

氨酸/苏氨酸蛋白激酶的保守序列为: Asp-Leu-Lys-Pro-Glu-Asn, 而酪氨酸蛋白激酶的保守序列则是: Asp-Leu-Arg-Ala-Asn 或 Asp-Leu-Ala-Ala-Arg-Asn。利用这些保守序列可以找到新的蛋白激酶。Hanks 于 1987 年找到了两个在丝氨酸蛋白激酶中高度保守的序列: DLKPEN 和 GTPEYLAPE, 并以此为探针在 HeLa 细胞的 cDNA 文库中找到了三个新的蛋白激酶。蛋白激酶根据结构,功能的不同,分成很多家族。如果我们找到了一个家族特有的保守序列,则可以此为探针在 cDNA 或基因组文库中寻找新的家族成员。1986 年 Knopf 等人用一个 32 碱基的蛋白激酶 C 的保守序列为探针,在鼠脑中找到了三个新的蛋白激酶 C (PKCI, PKCII, PKCIII), 与此同时,其它的研究则使 src, abl 及 fps 家族增添了新成员,我们还可以蛋白激酶基因的保守序列设计引物用 PCR 的方法获得新的激酶同源基因。Watson 等人在 1991 年利用丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的保守区设计引物,用反转录 PCR 方法获得了 5 个新的蛋白激酶 (PsPk1-5)。在这些开拓性的工作之后,是一大批新的蛋白激酶或其同源基因被发现。现在,利用蛋白激酶基因保守序列做探针或 PCR 引物以克隆新的蛋白激酶基因的方法已成为一项

极为普通和常规的实验技术,这使得我们得到的蛋白激酶或其同源基因的数目爆炸般增长。当然,除了上述我们曾经提到的保守序列之外,还存在着另外一些保守序列。在接近催化区的氨基末端的地方,有一段 Gly-x-Gly-x-x-Gly 序列,已发现在很多核酸结合蛋白上也有类似序列。它对于激酶与 ATP 的结合以及磷酸的转移至关重要。而距其约 80—180 个残基的三联体: Arg-Asp-Leu, Asp-Phe-Gly 和 Ala-Pro-Glu 对于保持催化活性则是必须的。

迄今为止发现的数百个蛋白激酶广泛存在于动物、植物、微生物中,其催化的底物亦多种多样,但作为磷酸基受体的氨基酸却不外乎 Ser, Thr, Tyr, Arg, His, Lys 以及 Cys 等,其中尤以 Ser, Thr, Tyr 最为常见。已发现的绝大多数蛋白激酶根据受体氨基酸的不同可分为两大类。即丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶与酪氨酸(Tyr)蛋白激酶。然而,尽管种类不同,作用方式及功能千差万别,但几乎所有的蛋白激酶在它们的催化区域都具有相似的氨基酸序列。进入 90 年代以来,Carol Featherstone 首先在裂殖酵母(Fission Yeast)中发现了 Ser/Tyr 蛋白激酶,几乎与此同时,David 等人也在酵母(*Saccharomyces Cerevisiae*)中发现了能同时磷酸化 Ser, Thr, Tyr 的蛋白激酶-Spk1。该酶具有典型的 Ser/Thr 激酶保守序列及其活性。但在细菌中表达时则具有催化 Ser/Thr 及 Tyr 磷酸化的双重功能,体外分析表明,Spk1 对于酪氨酸蛋白激酶的作用底物 Poly(Glu/Tyr)具有较弱的磷酸化活性。作者同时还检测了两种 Ser/Thr 蛋白激酶即依赖钙离子/钙调素的蛋白激酶 II 和依赖 cAMP 的蛋白激酶的催化亚基对于 Poly(Glu/Tyr)的作用,也发现 Tyr 被磷酸化,在这以后,动物、植物、微生物中陆续发现了一系列的类似激酶。它们广泛参与了信号传递,细胞分裂等各种生命活动。这一切说明 Ser/Thr 蛋白激酶与 Tyr 蛋白激酶的功能并非一成不变,其分类也是相对的。

蛋白激酶对于底物蛋白中 Ser, Thr 等氨基酸残基的磷酸化是有选择性的,往往只使特定

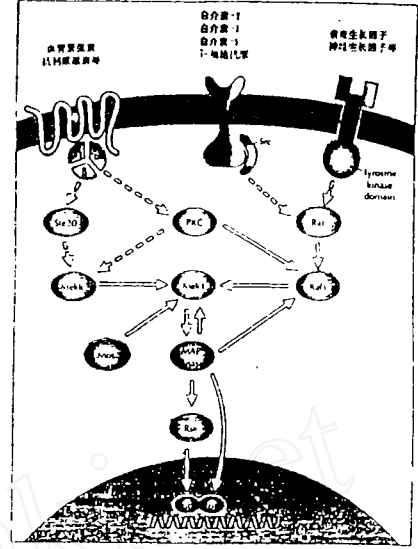


图 1 MAPK 的激活调控网络

- Rsk: ribosomal protein S6 kinase 其作用底物是核内的转录因子
- MAPK: mitogen activated protein kinase
- Mek 1: MAPK 的蛋白激酶,它同时催化 MAPK 的一个 Thr 与 Tyr 磷酸化
- Mekk: Mek1 的蛋白激酶
- Raf1: 一种蛋白激酶,由 raf1 原癌基因编码
- Ras: 一种 G 蛋白,由 ras 原癌基因编码
- Mos: 一种蛋白激酶,由 mos 原癌基因编码

部位的残基磷酸化,这种选择性取决于蛋白激酶可以识别的一个保守序列。蛋白激酶对靶位点的识别由其附近的蛋白质一级结构所决定。例如,依赖 cAMP 的蛋白激酶的识别序列为 R-R/K-X-S\*/T\* 和 R-X<sub>2</sub>-S\*/T\*, 依赖 cGMP 的蛋白激酶: (R/K)<sub>2,3</sub>-X-S\*/T\*, 蛋白激酶 C: (R/K)<sub>1,3</sub>, X<sub>2</sub>-S\*/T\* (X<sub>2,0</sub>, R/K<sub>1,3</sub>), 依赖 CaM 的蛋白激酶 II: R-X-X-S\*/T\*, P34<sup>cdc2</sup>: S\*/T\*-P-X-R。(\*: 磷酸化位点, X: 任意氨基酸)。远距离的氨基酸以及蛋白质的高级结构在此过程中的作用微乎其微,对于一个蛋白质,它所包含的磷酸化位点可能不止一个,它的作用可能在于不同的位点发生磷酸化会使蛋白质产生不同的结构,而每种结构则对应于一种功能,使其功能更具多样化,另外,例如: Gsk-3 无法识别序列是 S\*-X-X-X-S(p), 其靶位点下游的 Ser 磷

酸化是不可缺少的。否则 Gsk-3 无法识别,而这个 Ser 残基的磷酸化则由另外的蛋白激酶完成。这说明蛋白质的磷酸化往往是多个激酶协调作用的结果。

蛋白激酶的激活机制的研究一直很活跃。以依赖 cAMP 的蛋白激酶为例。它的无活性形式即  $R_2C_2$ 。调节亚基(R)上具有催化亚基(C)识别的磷酸化位点并以此与催化亚基结合,从而抑制了蛋白激酶的活性。当 cAMP 与调节亚基结合后,与催化亚基分离,从而使酶的催化区凸现出来,与正常底物结合,并催化其磷酸化。

当然,蛋白激酶的激活并不仅是线性的,它存在着一个调控的网络,例如 MAPK(mitogen activated protein kinase)的激活(见下页图1),从图中可以看出,MEK1 是这个 MAPK 活化网络的中心,它接受来自四面八方的信号,至少有六条途径通过激活 MEK1 从而活化 MAPK。并可将来自胞外的信息与核内的转录因子联系起来。这个复杂而又有效的网络充分表现了蛋白激酶活化的特性,不同系统之间的相互协调,即“Crosstalk”非常重要。

我们对于蛋白激酶的了解绝大部分来自动物和酵母。植物中蛋白激酶的研究工作一直比较缓慢,直到 1989 年才有第一个蛋白激酶基因克隆的报道。而发现的蛋白激酶的数量也远远少于动物和酵母。但是,蛋白激酶的重要地位是不容置疑的。人们很早就注意到植物细胞分裂与核内蛋白磷酸化之间的关系。在植物细胞有丝分裂期,组蛋白 H1 的磷酸化程度大大提高。1990 年,在大豆中纯化了一种能高效磷酸化组蛋白的蛋白激酶。这种蛋白激酶是依赖  $Ca^{2+}$  而不依赖钙调素( $Ca^{2+}$ -dependent/Calmodulin-independent)型即 CDPK。在胡萝卜、水稻、拟南芥菜中也发现了 CDPK 或其基因。植物中的 CDPK 的氨基端催化区与依赖钙离子/钙调素的蛋白激酶相似。而羧基端与钙调素(Calmodulin)相似。氨基端与羧基端之间,被连接区分开,CDPK 的催化区在体外具有不依赖钙离子的激酶活性。CDPK 在羧基端与

钙离子结合,而连接区可能是用来抑制 CDPK 活性的。

1989 年,利用抗体检测技术发现了第一个植物  $P34^{cdc2}$  的相似蛋白,随之在豌豆、苜蓿、大豆、水稻、挪威云杉、玉米以及拟南芥菜中陆续发现了 cdc2 的同源基因。其中一些与 cdc2 基因相似性很高,而另一些则较低,拟南芥菜中的一个 cdc2 同源基因的内含子/外显子结构与 cdc2 有较大差别。豌豆中发现的 4 个不同的 cdc2 基因,其活性在 S 期最高,而在 G2/M 期则较低,具有拟南芥菜的一个 cdc2 同源基因的转基因植物研究表明正常的 cdc2 功能对于植物的生长非常重要。这些似乎表明高等植物的细胞周期仍由  $P34^{cdc2}$  调节系统所控制。然而,植物中  $P34^{cdc2}$  的作用底物及机制尚不十分明了。

近年来,在植物中也发现了 MAPK 的相似蛋白。该激酶是真核生物信号传递中的关键因素。是一种 Ser/Thr 蛋白激酶。在烟草、拟南芥菜、苜蓿、豌豆以及矮牵牛中陆续发现了类似 MAPK 的蛋白。它在植物中的作用,可能是在发育过程中对各种胞内外信号产生应答反应。一些植物生长因子如植物生长素(auxin),乙烯(ethylene)可以活化 MAPK 似乎证明了这一假设,另外,MAPK 对植物的增殖、分化也非常重要,对于组织培养的植物细胞研究表明,分裂素(mitogen)可以激活一些受 c-jun, c-myc 调控的基因。这些与来自动物细胞的研究结果基本相同。

蛋白激酶也广泛参与了植物对干旱、盐胁迫、ABA 诱导、光诱导等的应答反应。Anderlberg 等人发现在小麦中,一种蛋白激酶受到 ABA 和干旱的诱导,其作用发生在转录水平上。而在拟南芥菜中,Takeshi 等人发现了两个受干旱及盐胁迫快速诱导表达的蛋白激酶基因。这两个基因在 1 小时内即对干旱及盐胁迫产生应答。其转录活性提高很多,它的作用可能是磷酸化一些反式作用因子,从而影响一些基因的表达。另外,Roux 等人报道在  $Ca^{2+}$  存在情况下,红光可以诱导豌豆核内蛋白的磷酸

化。而 Linx 等人则发现光信号直接诱导了豌豆蛋白激酶基因的转录, W. Driggs 证明蓝光可以诱导豌豆幼苗膜上蛋白激酶的活性。这些都表明蛋白激酶可能在光信号传导中扮演了重要角色。

近年来, 植物中陆续发现了具有受体特性的 Ser/Thr 蛋白激酶, 它们包括一些自交不亲和座(S-locus)的受体激酶(SRKs), 其胞外区富含 Cys。SRKs 基因突变的研究表明其自交不亲和性消失。表明 SRK 对于自交不亲和是非常重要的。在玉米及拟南芥菜中发现的 SRK 型的蛋白激酶则在植物的各个部位均有表达, 而不是仅仅局限于花粉柱头中。在拟南芥菜中发现了另一类受体型的 Ser/Thr 蛋白激酶, 它包括一个富含 Leu 的胞外区与其它蛋白质相互作用, 另一类与表皮生长因子受体相似的蛋白激酶也在拟南芥菜中被分离。

随着植物抗病基因的研究不断深入, 逐渐揭示了抗病基因与蛋白激酶之间的联系。Michael 等人克隆了一个拟南芥菜的抗病基因 RPS<sub>2</sub>, 序列分析表明, 它包含有一段保守序列, 这一保守序列存在于一系列激酶的 ATP/GTP 结合位点上, 抗烟草花叶病毒 N 基因的序列中也有三个与蛋白激酶同源的保守序列位于与 ATP/GTP 结合的区域, 这些似乎显示 RPS<sub>2</sub> 与 N 基因产物具有蛋白激酶的活性, 在西红柿中发现的抗真菌病基因 Cf-9 与某些受体蛋白激酶具有同源性, 然而同源的是这些受体蛋白激酶与配基的结合区而不是催化区。在西红柿中发现的抗病基因 Pto 编码一个 321 个氨基酸的蛋白质, 序列对比分析表明与其催化区相似性最高的 5 个蛋白质, 同属一个植物丝氨酸受体蛋白激酶家族, 其中一个由油菜的 SRK(S-locus receptor kinase)基因编码, 该基因在花粉一柱头自交不育中具有重要作用, 但是由 Pto 基因推测的产物缺少受体蛋白激酶的转膜区以及胞外的配基结合区。

Song 等人则克隆了一个水稻抗白叶枯病基因 Xa21, 该基因产物全长 1011 个氨基酸。其中有 11 个氨基酸是在所有蛋白激酶中都存在的保守位点。而位于羧基端的保守序列 DVKPE 以及 GTIGYAAPE, 则显示它属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族, 其结构则与拟南芥菜中的受体蛋白激酶类似, 蛋白质序列分析表明在其氨基端还含有 LRR 区(leucine-rich region), LRR 区参与蛋白质相互作用, 这似乎表明, LRR 蛋白与蛋白激酶在植物抗病的信号传递过程中相互作用。

蛋白激酶的研究虽然进展很快, 但仍有很多我们尚未了解的东西。如: 一些激酶的催化和调控机制以及生化性质分析等。这些都有待于进一步的研究。蛋白激酶的作用几乎和每一种生物生命过程都有联系, 对于蛋白激酶研究的不断深入, 将有助于我们更深刻地了解生命现象的本质。

## 参考文献

1. Anders, K. et al plant molecular Biology 27: 391—403 (1995).
2. Hirayama, T. et al Plant Molecular Biology 26: 791—803 (1994).
3. Hanks, S. K. PNAS 84: 388—392(1987).
4. Hanks, S. K. et al Science 241: 42—51(1988)
5. Hunter, T. Cell 50: 823—829(1987).
6. Hunter, T. Cell 80: 225—236(1995).
7. Martin, G. B. et al Science 262: 1432—1436(1993).
8. Mindrinos, M. et al Cell 78: 1089—1099(1994).
9. Pelech, S. L. Current Biology 3: 513—515(1993).
10. Stern, D. F. et al. Molecular and Cellular Biology 11: 987—1001(1991).
11. Urao, T. et al Mol Gen Genet 244: 331—340(1994).
12. Veronlque, D. F. et al Plant Molecular Biology 27: 339—350(1995).
13. Whitham, S. et al Cell 78: 1101—1115(1994).
14. Zhao, Y. et al Plant Molecular Biology 26: 791—803 (1994).