

# 缺铁胁迫的铁转运激活蛋白——AFT1\*

颜 芳 印莉萍 刘祥林

(首都师范大学生物系 北京 100037)

关键词: 缺铁胁迫, AFT1

中图分类号: Q93-31 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(1999)-05-0361-03

酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是一种优良的研究许多真核细胞的基础代谢过程的模式生物。1995年,美国科学家(Yamaguchi-Iwai *et al*)利用筛选铁代谢异常的酵母突变体方法,克隆并鉴定了铁转运激活蛋白(An activator of ferrous transport, AFT1)<sup>[1]</sup>。将酵母 *fre1* 的 5' 上游区融合到 *his3* 基因上,由于铁对 *fre1* 启动子的影响,这种结构在铁充足的条件下,不能表达,转化到不含有 *his3* 的酵母细胞中后,细胞在高铁缺组氨酸的培养基上死亡,将少数存活的突变体制备 cDNA 表达文库,转化到含有 *fre1-his3* 结构的细胞中,在高铁缺组氨酸的培养基上获得的克隆即 AFT1 的 cDNA 克隆<sup>[1,4]</sup>。近年来,AFT1 在缺铁条件下,激活一批高亲和铁转运系统的基因(约 10 余种)的转录<sup>[2]</sup>,以及它的显性突变等位基因 AFT1-1<sup>mp</sup>调控着细胞周期蛋白(G1 cyclin)<sup>[3]</sup>等的研究取得长足进展。

## 1 AFT1 的核酸序列

核酸序列测定表明:AFT1 基因序列长为 3kb 左右,包括 515 个核苷酸的 5' 端非翻译区,2070 个核苷酸的单一的开放阅读框(ORF)和 poyA 尾之前的 134 个核苷酸的 3' 端非翻译区。5' 端非翻译区内还存在两个小的 ORF,证明 AFT1 的表达是在翻译水平上调节的。AFT1 cDNA 克隆包括基因组序列的全部 ORF。分别对 AFT1 的 cDNA 和其基因组克隆进行测序,没有发现任何差异,而且两段序列的 ORF 可以完全配对,证明基因组中的 AFT1 没有内含子存在。AFT1 定位在酵母的第二条染色体上,在基因组中是单拷贝的。AFT1 的转录物(mRNA)近似 2.8kb,中等丰度,它的水平不受细胞内铁状态的影响<sup>[1,3]</sup>。所以推测铁胁迫信号对 AFT1 的诱导是在翻译或翻译后水平的调控。

## 2 AFT1 蛋白(Aftpl)

Aftpl 编码一个 98kD 的蛋白,定位于细胞核。这个

蛋白相当亲水,没有跨膜结构域或疏水前导序列。ORF 编码 690 个氨基酸的多肽,分子量为 77.4kD。蛋白的功能结构域具有一个潜在的 CDC28 位点,可以进行磷酸化调控;2 个潜在的 PKA 位点和 10 个潜在的 N-glc 位点<sup>[1,8]</sup>。AFT1 与其它转录因子的氨基酸序列比较发现,Aftl 具有与已知转录因子的序列相似性:

(1) N 端具有一个基本残基簇<sup>[1]</sup>,它可能涉及 DNA 的识别;

(2) 具有富含谷氨酰胺的结构域<sup>[1]</sup>,此结构域是许多转录因子共有的<sup>[4]</sup>;

(3) 富含组氨酸,说明它可能具有与金属相结合的能力<sup>[5]</sup>,或是具有接受某些来自金属信号的能力。

## 3 AFT1 的功能

**3.1 AFT1 的转录激活作用** 最近几年,国外的研究者对酵母的铁转运机制和调节的研究取得重要进展<sup>[6,12]</sup>。酵母细胞利用两种不同的铁转运系统来识别二价铁,一种为低亲和力和系统,由 FET4 组成;一种为高亲和力和系统,需要质膜上铁还原酶的活性—FER1 和 FER2; Fe-transporter (转运蛋白)—FET3 (多铜氧化酶) 和 FTR1 (Fe<sup>2+</sup> 渗透酶) 的复合物;以及这两个转运系统所必需的质膜铜转运蛋白—CTR1,胞内铜转运蛋白—CCC2<sup>[5,7]</sup>。

AFT1 对细胞表面铁还原酶活性和亚铁转运的影响十分重要。在铁胁迫条件下, AFT1 对 FRE1、FRE2、FET3、FTR1、CCC2 以及 FTH1 (一种功能不明的 FTR1 类似物)等在其转录水平上进行调控。它对靶基因的转

\* 国家自然科学基金资助项目 (No.39770074)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No.39770074)

收稿日期: 1998-08-27, 修回日期: 1999-03-09

录具有激活作用,能够专一地与特定 DNA 的序列相结合,调节靶基因的表达。目前已鉴定出受 AFT1 调节的靶基因结合位点的共有序列为:PyPuCACCCPu<sup>[7]</sup>。

当酵母基因组的全序列测定工作于 1996 年 4 月完成后,发现 5 个未鉴定的 ORFs,其中 4 个与 FRE1 和 FRE2 的同源性分别在 30% 左右。FRE3-FRE6 通过 AFT1 专一性调控。这 4 个基因既可在用 Fe-整合剂处理的铁吸收有限情况下表达,又可在缺少高亲和铁转运系统的细胞中表达。在 Aft1 细胞中,FRE3-FRE6 转录活性提高,而在 Aft1 突变无效的细胞中,FRE3-FRE6 基因受到抑制。由此证明,铁的调节是通过 Aft1 转录激活子的产生来实现的<sup>[2]</sup>。

AFT1 的激活与环境刺激是如何反映在相关基因的转录水平上的,对于 AFT1 功能的认识十分关键。体内足迹实验发现,铁信号抑制 AFT1 对 DNA 的结合。这可能是由于铁直接结合到 AFT1 上,或与上游区结合使 AFT1 产生变化。几种可能的机制如下<sup>[7]</sup>:

(1) 在铁充足的条件下,AFT1 可能被降解。这种机制与脊椎动物中铁调节蛋白(IRP2)对铁的调节类似。

(2) AFT1 与靶基因的结合可能被蛋白的细胞定位所调控。在铁充足的条件下,AFT1 蛋白可能被分配在细胞核之外。所以只有在缺铁条件下,AFT1 才可在核内发挥其转录激活子的作用。

(3) AFT1 与靶基因的亲和力可能被调节,此种机制可能与脊椎动物铁调节蛋白(IRP1)的调节机制类似。

AFT1 是一个转录激活因子,同时它也是高亲和力和铁转运复合物的组分。另外,它可能调控细胞内铁的转运和利用<sup>[8]</sup>。

### 3.2 AFT1 与细胞周期

实际上,AFT1 在 1995 年以前已被分离出来,当时被命名为 RSC1,并证明它涉及营养缺乏条件下细胞大小的调节<sup>[11]</sup>。后期实验发现,aft1- $\Delta$ 1 突变体细胞比野生型细胞体积大与缺铁相关。

AFT1 的过表达会导致细胞在细胞周期 G1 期的生长停滞,细胞体积变大。这种现象不是由铁或铜的吸收增加而引起的毒性,或是由过量产生 Aft1 的细胞中铁转运受抑制造成的。这表明 Aft1 还参与铁同化之外的其它细胞过程。Aft1 介导的生长抑制不能被铁的增加所抑制,因而铁不是 Aft1 活性的直接抑制子。暂时的或

长久的抑制细胞生长的条件,如碳源缺乏或细胞从发酵代谢到呼吸代谢的转换时,会引起 Aft1 的磷酸化作用。但是,由于  $\alpha$  因子处理引起的 G1 期暂时生长停滞不能导致 Aft1 的磷酸化作用。因此 Aft1 磷酸化作用与生长停滞的相互作用可能存在。当生长恢复并且 Aft1 去磷酸化后,缺铁时 FRE1、FRE2、FET3 的表达才被诱导。这证明磷酸化作用可能是 Aft1 失活的一种机制<sup>[6]</sup>。

对 AFT1-1<sup>op</sup> 突变体的研究发现,生长停滞是由于 G1 期特异的细胞周期蛋白 Cln1 和 Cln2<sup>[9,10]</sup> 的低水平表达。AFT1-1<sup>op</sup> 突变体中,过量的铁积累引起 Cln1mRNA 和 Cln2mRNA 的翻译阻滞。铁可能是直接或间接地改变了翻译机制中的某种组成部分,从而减少这些转录物的翻译<sup>[3]</sup>。

总之,只有细胞生长在具有有效碳源的代谢适应条件下,Aft1 才能成为铁吸收诱导和其它推测的细胞过程的调节因子。细胞对有效碳源的适应可能比对其它的营养信号在代谢上具有优势,而 Aft1 则在连接两种信号上起作用<sup>[8]</sup>。

### 4 问题与展望

在酵母中鉴定的基因是否能用来寻找植物或动物涉及铁吸收的基因? 这一问题在 1996 年的一个学术会议上已经证明是可行的<sup>[5]</sup>。到目前为止尚无高等植物细胞质膜铁转运系统被克隆鉴定的报道。在其它物种中酵母铁基因的同系物的鉴定将极大地促进植物和动物中铁代谢机制的澄清。AFT1 在高等植物根细胞是否存在,高等植物是否与最简单的真核生物酵母有相似的分子调控机制是我们急迫研究的重要课题。

90 年代以来,随着植物营养的分子生物学研究飞速发展,科学工作者试图分离出各种营养相关基因,通过转基因方法改变作物的营养遗传性状,从而提高作物营养水平及产量。若能够在植物中克隆和鉴定 AFT1,就为研究高等植物在铁胁迫条件下的应答的分子机理提供了可能性。转录因子可以调控多个功能基因的表达,因此在提高植物对铁胁迫抗性的遗传育种中,可以利用基因工程技术,将其整合到作物染色体基因中,加强或减弱某些基因的表达;或者改善或增强 AFT1 的表达和调控能力,从而达到有效控制铁营养的目的。也可利用调节基因的表达蛋白抗体进行铁的吸收、转化和基因表达调控等过程的研究,进一步揭示高等植物铁元素吸收的分子机理。

研究转录因子的作用机理,不论在分子生物学理论,还是在转基因改良品种的实践中都具有重大而深远的意义。编码转录因子的基因可能是一系列胁迫基因的关键基因或开关基因。它为研究植物抗性基因的时空表达调控提供了有力的工具。也正是因为诱导激活型或阻遏型的转录因子基因可能是关键调控基因,所以在转入植物后,它可能会比转入单一功能的基因起到事半功倍的作用。转入植物体的基因可以是转录因子基因本身,也可以是转录因子的 DNA 结合结构域即顺式作用元件与一些结构基因的重组子。

### 参 考 文 献

- [1] Yamaguchi-Iwai Y, Dancis A, Klauser R D. *EMBO J*, 1995, **14**(6):1231~1239.
- [2] Martins L T, Jensen L T, Simon JR *et al*. *J Biol Chem*, 1998, **273**(37):23716~23721.
- [3] Philpott C C, Rashford J, Yamaguchi-Iwai Y *et al*. *EMBO J*, 1998, **17**(7):5026~5036.
- [4] Mitchell P J, Tjian R. *Science*, 1989, **145**:371~378.
- [5] Aslwith C C, de Silva D, Kaplan J. *Mol Microbio*, 1996, **20**(1):27~34.
- [6] 印莉萍, 曲占良, 邱泽生. *微生物学报*, 1999, **26**(3).
- [7] Yamaguchi-Iwai Y, Stearman R, Dancis A *et al*. *EMBO J*, 1996, **15**(13):3377~3384.
- [8] Casas C, Aldea M, Espinet C *et al*. *Yeast*, 1997, **13**:621~637.
- [9] Benton B K, Tinkelenberg A H, Jean D *et al*. *EMBO J*, 1993, **12**:5267~5275.
- [10] Cvrcková F, Nasmyth K. *EMBO J*, 1993, **12**:5277~5286.
- [11] Gil R, Zueco J, Setandreu R *et al*. *Yeast*, 1991, **7**:1~14.
- [12] Hassett R F, Romeo A M, Kosman D J. *J Biol Chem*, 1998, **273**(13):7628~7636.