

生长抑制因子 (GIF) 与 G 蛋白 Rab3a 直接相互作用*

康巧华 陈巧林¹⁾ 任宏伟 茹炳根^{**}

(北京大学生命科学学院, 蛋白质工程与植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 生长抑制因子 (growth inhibitory factor, GIF), 又称金属硫蛋白-3, 为 68 个氨基酸组成的脑特异性金属硫蛋白, 具有广泛的生理功能; GIF 可能与阿尔茨海默氏症 (Alzheimer's) 病理相关, 在 Alzheimer's 脑提取物存在下, 还对神经细胞具有特异的生长抑制活性。然而, 对其发挥生长抑制作用的分子机制并不清楚。运用酵母双杂交系统从人脑 cDNA 文库中筛选与 GIF 相互作用因子, 从 4.1×10^6 个人脑 cDNA 文库转化子中, 首次筛选到 Ras 家族 G 蛋白 Rab3a C 端, 包含 87 个氨基酸的片段能与 GIF 相互作用; 用 PCR 自人胎盘总 cDNA 中获得包含完整 Rab3a 编码序列的 cDNA; 通过酵母双杂交实验表明, 全长 Rab3a 蛋白亦能与 GIF 相互作用。免疫共沉淀和蛋白质印迹实验进一步验证了 GIF 与 Rab3a 在哺乳动物细胞中可以相互作用; 而且, Rab3a 是以 GTP 结合形式 (GTP-Rab3a) 与 GIF 发生相互作用。

关键词 生长抑制因子, 阿尔茨海默氏症, 酵母双杂交系统, Rab3a, 免疫共沉淀

学科分类号 Q74, Q512

生长抑制因子 (growth inhibitory factor, GIF), 由 68 个氨基酸组成, 与金属硫蛋白 (MT) 家族成员 (如 MT1、MT2) 具 70% 以上的序列同源性^[1,2]; 具有 MT 家族成员的共同特性, 包括相同的半胱氨酸排列方式和数目, 金属 (如 Cd、Cu、Zn 等) 结合特性等^[3], 因而又称之为金属硫蛋白-3 (MT-3)。GIF 主要分布于脑部中枢神经系统, 在 Alzheimer's 症脑提取物的存在下, 对培养的神经元细胞具有特异的生长抑制活性, 而金属硫蛋白家族的其他成员 (如 MT1、MT2) 却无此活性^[3~6], 因而认为与 Alzheimer's 症病理相关^[1]。GIF 的生物活性依赖于脑提取物的存在, 单独的 GIF 或单独的脑提取物均不具有生长抑制活性; 这表明, GIF 可能是与脑提取物中的其他因子协同作用而发挥其抑制功能的。迄今, 对 GIF 生长抑制功能的分子机理仍不太清楚, 因而, 寻找与 GIF 相互作用的协同因子就成为探索 GIF 分子机理的一个重要途径。

酵母双杂交系统是近年来发展起来的研究蛋白质间相互作用的分子生物学方法, 也是寻找与目的蛋白相互作用的未知蛋白质和研究蛋白质功能的有力工具^[7]。本研究运用酵母双杂交系统技术, 从人脑 cDNA 表达文库中首次筛选到与 GIF 相互作用的蛋白质, 为深入研究 GIF 的分子机理进行了初步探索。

1 材料和方法

1.1 质粒、酵母和文库

酵母双杂交系统试剂盒购自 Invitrogen 公司, 该系统以 *HIS* 和 *lacZ* 作为两报告基因。pHyblex 质粒含 *LexA* 基因 (编码 DNA 结合结构域 *LexA*), 用于构建饵 (bait); pYESTrp2 质粒含 *BA42* 基因 (编码 DNA 激活功能区 *BA42*), 用于构建相互作用陷阱 (prey)。人脑 cDNA 文库以 pYESTrp2 质粒为载体, 均购自 Invitrogen 公司。

带 Flag 标签 (小肽 MDYKDDDDK) 的真核表达载体 pFlag-CMV-2 和带 HA (hemagglutinin) 标签 (小肽 MYPYDVPDYA) 的真核表达载体 pSV-HA 均由军事医学科学院生物工程研究所马清钧教授及杨淑静博士惠赠。抗 Flag 标签的小鼠单抗购自 Sigma 公司, 抗 HA 标签的大鼠单抗购自 Roche 宝灵曼公司; 碱性磷酸酶 (AP) 偶联二抗购自 Promega 公司, 检测 AP 活性的底物试剂盒为华美生物工程公司产品。

正常人胎盘总 cDNA 购自美国 Biochain 公司。

* 国家“九五”攻关合同项目资助 (96-C02-01-09)。

** 通讯联系人。

¹⁾ 扬州大学畜牧兽医学院, 扬州 225009。

Tel: 010-62751842, E-mail: Rulab@pku.edu.cn

收稿日期: 2001-02-23, 接受日期: 2001-06-18

实验 PCR 用引物全部由上海生工生物有限公司合成; 限制性内切酶为 Biolabs 公司产品; DNA 测序由上海博亚生物技术公司承担。

1.2 饵质粒 pHyblex-GIF 构建

将本实验室保存于 pBluscript 质粒中的 GIF cDNA (pBS-GIF) 用 *Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切后, 电泳回收酶切 DNA 小片段, 将此片段插入经 *Eco*R I 和 *Sal* I 消化的双杂交系统质粒 pHyblex 中, 从而形成饵质粒 pHyblex-GIF, 测序结果表明 GIF 与 DNA 结合结构域蛋白 LexA 顺框。

1.3 Rab3a cDNA 的克隆

从 Internet 网上搜索到人 Rab3a cDNA 的完整序列^[8], 设计两 PCR 引物用于扩增完整的 Rab3a 编码序列; 上游引物序列: 5'-CGCGGATCCATGGCATCCGCCACAGACTCGCG-3' (下划线示 *Bam*H I 位点), 下游引物: 5'-CCGCTCGAGTCAGCAGGCGCAGTCCTGG-3' (下划线示 *Xho* I 位点)。以正常人胎盘总 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 预期长度产物回收经 *Bam*H I / *Xho* I 双切, 克隆于酵母双杂交系统质粒 pYESTrp2 的 *Bam*H I / *Xho* I 位点。

双杂交系统实验使用和构建的各种质粒载体的结构见图 1 所示。

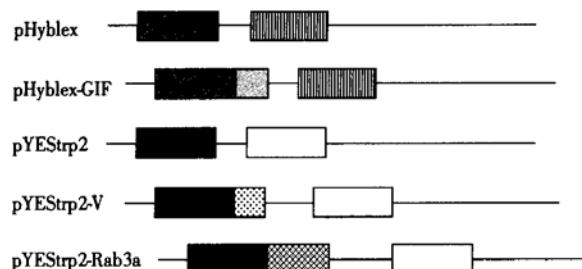


Fig. 1 Schematic maps of constructs and genes used in the yeast two-hybrid system

■: LexA gene; □: GIF gene; ▨: Zeocin gene; ■: BA42 gene; □: *trp1* gene; ▤: V fragment; ▩: Rab3a gene.

1.4 标签质粒的构建

将 GIF 克隆于带 Flag 标签的真核表达载体 pFlag-CMV-2 中, 即得 pFlag-CMV-2-GIF, 表达 Flag-GIF 融合蛋白; 将 Rab3a 克隆于带 HA 标签的真核表达载体 pSV-HA 中, 即得 pSV-HA-Rab3a, 表达 HA-Rab3a 融合蛋白。

论文中构建的所有载体均经双向测序证实, 并保证翻译时阅读顺框。

1.5 酵母双杂交实验

人脑文库质粒的用量约为 400 μ g; 酵母双杂交

系统筛选文库的实验方法参照 Invitrogen 公司和 Clontech 公司的说明书, 并稍作改进。

1.6 免疫共沉淀和蛋白质印迹

将质粒组合 pFlag-CMV-2-GIF (10 μ g), pSV-HA-Rab3a (10 μ g) 及 pFlag-CMV-2-GIF + pSV-HA-Rab3a (10 μ g + 10 μ g) 分别与 10 μ l 脂质体转染试剂 Lipofectamine (Life Technologies 公司产品) 混合共转染 COS7 细胞, 更换完全培养液 6 h 后加入 CdCl₂ 至终浓度为 5 μ mol/L, 加入 ATP 和 GTP 至终浓度各为 0.1 mmol/L; 继续培养 12 h 后, 收集细胞并经洗涤后在 1 ml 新鲜制备的含蛋白酶抑制剂的 Lysis 缓冲液 (1% Nonidet P-40, 50 mmol/L HEPES (pH 7.0), 5 mmol/L EDTA, 1% 脱氧胆酸钠 (sodium deoxycholate), 1 μ mol/L pepstatin, 2 μ g aprotinin) 中冰浴温和裂解细胞 1 h (裂解 Lysis 缓冲液中加入 CdCl₂、ATP 和 GTP 至终浓度各为 1 mmol/L, 加入 β -巯基乙醇至终浓度 1%), 于 4 $^{\circ}$ C, 15 000 $\times$ g, 离心 10 min, 收集上清, 加入 4 μ g (1 μ l) 抗 Flag 单抗, 冰浴振摇 1 h 后, 加入 50 μ l Proteir-G agarose, 继续冰浴振摇共沉淀 3 h。12 000 $\times$ g, 离心 30 s, 小心弃上清; 用含 1 mmol/L CdCl₂、ATP 和 GTP 及 1% β -巯基乙醇的 Lysis 缓冲液洗涤 3 次。最后 12 000 $\times$ g, 离心 1 min, 小心弃尽上清, 加入 30 ~ 40 μ l 1 $\times$ 上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 3 min 后吸上清电泳, 转膜, 用抗 HA 的大鼠单抗为一抗, 用山羊抗大鼠 IgG-AP 作为二抗, 以 NBT/BCIP 作为显色底物。

2 结 果

2.1 酵母双杂交系统文库筛选

单独的饵质粒 pHyblex-GIF 转化酵母, 经检测转化子既不能在 His 缺省培养基上生长也不能使 X-gal 变蓝, 表明其适合于双杂交系统, 可用于文库筛选。共筛选了约 4.1×10^6 克隆, 挑选了缺省培养基上较大的 22 个阳性酵母; 其中 5 个蓝色显示较强。提取质粒电击转化 *E. coli*, 将得到的 5 个质粒 pYESTrp2-I、II、III、IV、V 重新与 pHyblex-GIF 共转酵母, 只有 pYESTrp2-V 与饵质粒 pHyblex-GIF 共转化才能在 His 缺省培养基上生长和使 X-gal 变蓝, 为真正的阳性文库质粒。阳性克隆质粒 pYESTrp2-V 插入片段 V 长度约为 600 bp, 测序结果和网上同源性检索表明插入片段 V 编码人小分子 G 蛋白 Rab3a C 端 87 个氨基酸。序列为: GNKCDMEDERVVSSERGRQLADHLGFEFFFEASAKDNINVKQTFERLVDVICEKMSSESLDTADPA-

VTGAKQGPQLSDQQVPPHQDCAC.

2.2 Rab3a cDNA 的克隆

以正常人胎盘总 cDNA 为模板, PCR 扩增得到长度约 700 bp 的特异性片段 (图 2), Rab3a 蛋白由 220 个氨基酸组成, 因而 PCR 产物长度与预期相符. 产物克隆于质粒 pYESTrp2 的 *Bam*H I / *Xho* I 位点 (图 3), 测序表明与已发表的自人胎盘 Rab3a cDNA 相比: 我们自胎盘获得的 Rab3a cDNA 编码区核苷酸有 5 个不同, 而翻译成氨基酸序列表明与发表的 Rab3a 蛋白完全一致^[8, 9], 这可能是基因多态性的原因. 克隆的 Rab3a 氨基酸序列如下: MASATDSRYGQKESDQNFDMFKILIIG-NSSVGKTSFLFRYADDSFTPAFVSTVGIDFKVK-TIYRNDKRIKLQIWDTAGQERYRTITTAYYRG-AMGFILMYDITNEESFNAVQDWSTQIKTYSWDNA-QVLLV GNKCDMEDERVVSSERGRQLADHLGE-EFFEASAKDNINVKQTFERLVDVICEKMSESLD-TADPAVTGAKQGPQLSDQQVPPHQDCAC. 下划线部分为阳性克隆 pYESTrp2-V 中插入片段 V 编码的氨基酸序列.

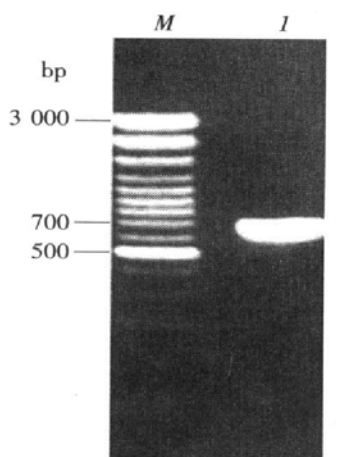


Fig. 2 PCR for Rab3a cDNA

M: 100 bp DNA ladder; I: PCR product.

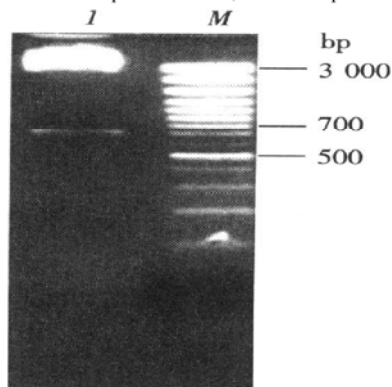


Fig. 3 Endonucleases analysis of pYESTrp2 Rab3a (*Bam*HI + *Xho*I)

M: 100 bp DNA ladder; I: pYESTrp2-Rab3a.

2.3 Rab3a 与 GIF 在酵母中的相互作用

将 PCR 扩增所得的全长 Rab3a 克隆于双杂交载体 pYESTrp2, 得重组质粒 pYESTrp2-Rab3a, 与饵质粒 pHyblex-GIF 共转化酵母, 结果共转化子既能在 His 缺省培养基上生长, 亦能使 X-gal 变蓝 (图 4), 表明全长的 Rab3a 与 GIF 能相互作用.

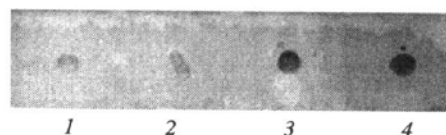


Fig. 4 Colony lift filter assay for β -LacZ activity of yeast transformed with plasmid

1: pYESTrp2-Rab3a; 2: pHyblex+ pYESTrp2-Rab3a; 3: pHyblex-GIF+ pYESTrp2-V; 4: pHyblex-GIF+ pYESTrp2-Rab3a.

2.4 Rab3a 与 GIF 在 COS7 细胞中的相互作用

为了进一步证实 Rab3a 与 GIF 相互作用真实性, 通过免疫共沉淀实验来验证它们在哺乳动物细胞中的相互作用. 分别在 COS7 细胞中转染三种质粒组合, 即 pFlag-CMV-2-GIF, pSV-HA-Rab3a 及 pFlag-CMV-2-GIF + pSV-HA-Rab3a. 实验中, 用抗 Flag 抗体免疫沉淀, 用抗 HA 抗体杂交. 结果显示有特异性的预期条带, 大小约 25 ku. 表明: 只有 pFlag-CMV-2-GIF 与 pSV-HA-Rab3a 质粒共转染细胞并添加 GTP 时 (包括在培养液中辅加 GTP), GIF 与 Rab3a 才能相互作用, 因而表明 Rab3a 是以 GTP 结合形式与 GIF 相互作用 (图 5).

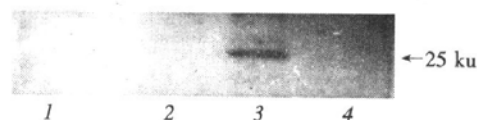


Fig. 5 Coimmunoprecipitation and Western blotting results

Protein G agarose was used for coimmunoprecipitation and anti-mouse Flag was used as primary antibody for Western blotting. 1: COS7 transfected with pFlag-CMV-GIF; 2: COS7 transfected with pSV-HA-Rab3a; 3: COS7 transfected with pFlag-CMV-GIF and pSV-HA-Rab3a, supplemented with GTP; 4: COS7 transfected with pFlag-CMV-GIF and pSV-HA-Rab3a.

3 讨 论

3.1 GIF 主要分布于锌能神经元突触泡中, 具有参与 Zn 能神经元的代谢 (包括促进 Zn 进入神经元、储存和 Zn 在突触之间的传递)^[10]、参与中央神经系统的损伤修复^[11]、清除自由基等广泛的生理功能^[12]. Rab3a 为小分子单亚基 G 蛋白, 属于

Rab 家族, 由 220 个氨基酸组成, 分布于内分泌细胞与神经细胞突触小泡, 调节细胞分泌和神经递质的释放. 目前, 已发现 Rabphilin-3^[13, 14]、RIM^[15] 及 Noc2^[16] 三个 Rab3a 效应子 (effector); 研究表明, 在脑部, GTP-Rab3a 与其效应子蛋白 Rabphilin-3^[13, 14] 或 Noc2 结合, 以一种 Ca^{2+} 依赖形式调节神经递质的释放, 具有十分重要的生理意义; 除此之外, Rab3a 还与 Rabin3^[16]、Mss4^[17] 和钙调素^[18] 等蛋白质结合, 参与 Rab3a 调控神经递质的释放. 脑 GIF 与 Rab3a 同存在于神经突触泡中, 因而它们之间的直接相互作用暗示 GIF 可能参与调控神经递质的释放, GIF-Rab3a 相互作用可能具有生理功能上的重要性.

3.2 Rab3a 与 GIF 相互作用的条件初探

GIF 由 α 和 β 两个结构域构成, α 结构域结合 4 个二价金属, β 结构域结合 3 个二价金属, 每个 GIF 分子能结合七个二价阳离子^[3], 为了保持 GIF 构象, 我们在细胞培养液中加入低浓度的 CdCl_2 而不至于对细胞产生较大的毒害; 由于金属硫蛋白上存在结合 ATP 的位点^[19], Rab3a 作为 G 蛋白, 能结合 GTP, 因而在细胞培养液中也加入了低浓度的 ATP 和 GTP, 细胞裂解后则将它们浓度相应升高, 以尽量满足二者发生相互作用的条件. 我们的研究还初步发现, 在免疫共沉淀实验中, GIF 与 Rab3a 间的直接相互作用依赖于 GTP 和 Cd^{2+} , 表明 Rab3a 是以 GTP 结合形式 (GTP-Rab3a) 与 GIF 发生相互作用的, 并且要求 GIF 保持原有的构象.

通过酵母双杂交系统发现 GIF 与 Rab3a 间的相互作用, 又经免疫共沉淀实验予以证实, 表明 Rab3a 与 GIF 能直接发生相互作用. Rab3a 的效应子蛋白 Rabphilin-3, RIM 及 Noc2 在 N 端都有一个相似的锌指结构^[16], 而 GIF 对锌 (Zn) 有很强的结合能力^[3], GIF 是否在 Rab3a 与其效应子间起桥梁作用? 或者调节它们之间的结合? 等等都值得进一步的研究.

GIF-Rab3a 间的相互作用, 进一步支持了 GIF 参与调节神经递质代谢的观点^[10, 12]; 目前已发现多个因子与 Rab3a 相互作用, 因而 GIF-Rab3a 间相互作用的生物学意义, GIF 与其他 Rab3a 相互作用因子间的关系以及 GIF-Rab3a 相互作用与 Alzheimer's 症病因的联系等方面尚待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Uchida Y, Takio K, Titani K, *et al.* The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron*, 1991, **7** (2): 337~ 347
- 2 Palmiter R D, Findley S D, Whitmore T E, *et al.* MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (14): 6333~ 6337
- 3 Sewell A K, Jensen L T, Erickson J C, *et al.* Bioactivity of metallothionein-3 correlates with its novel β domain sequence rather than metal binding properties. *Biochemistry*, 1995, **34** (14): 4740~ 4747
- 4 Yamada M, Hayashi S, Hozumi I, *et al.* Subcellular localization of growth inhibitory factor in rat brain: light and electron microscopic immunohistochemical studies. *Brain Res*, 1996, **735** (2): 257~ 264
- 5 Erickson J C, Sewell A K, Jensen L T, *et al.* Enhanced neurotrophic activity in Alzheimer's disease cortex is not associated with down-regulation of metallothionein-III (GIF). *Brain Res*, 1994, **649** (1-2): 297~ 304
- 6 Uchida Y, Ihara Y. The N-terminal portion of growth inhibitory factor is sufficient for biological activity. *J Biol Chem*, 1995, **270** (7): 3365~ 3369
- 7 Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 1989, **340** (6230): 245~ 246
- 8 Zahroui A, Touchot N, Chardin P, *et al.* The human Rab genes encode a family of GTP-binding proteins related to yeast YPT1 and SEC4 products involved in secretion. *J Biol Chem*, 1989, **264** (21): 12394~ 12401
- 9 Liu Y, Li J, He J J. Functional cloning and characterization of human fetal brain cDNAs. *Microbiology and Immunology*, 2000, **28** (5): 11~ 26
- 10 Erickson J C, Hollopeter G, Thomas S A, *et al.* Disruption of the metallothionein-III gene in mice: analysis of brain zinc, behavior, and neuron vulnerability to metals, aging, and seizures. *J Neurosci*, 1997, **17** (4): 1271~ 1281
- 11 Hozumi I, Inuzuka T, Tsuji S. Brain injury and growth inhibitory factor (GIF) - a minireview. *Neurochem Res*, 1998, **23** (3): 319~ 328
- 12 Aschner M, Cherian M G, Klaassen C D, *et al.* Commentary: metallothionein in brain - the role in physiology and pathology. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997, **142** (2): 229~ 242
- 13 Geppert M, Goda Y, Stevens C F, *et al.* The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature*, 1997, **387** (6635): 810~ 814
- 14 Chou J H, Jahn R. Binding of Rab3A to synaptic vesicles. *J Biol Chem*, 2000, **275** (13): 9433~ 9440
- 15 Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, *et al.* Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic vesicle fusion. *Nature*, 1997, **388** (6642): 593~ 598
- 16 Brondyk W H, McKiernan C J, Fortner K A, *et al.* Interaction cloning of Rabin3, a novel protein that associates with the Ras-like GTPase Rab3A. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, **15** (3): 1137~ 1143
- 17 Burton J L, Burns M E, Gatti E, *et al.* Specific interactions of Mss4 with members of the Rab GTPase subfamily. *EMBO J*, 1994, **13** (23): 5547~ 5558
- 18 Park J B, Farnsworth C C, Glomset J A. Ca^{2+} /calmodulin causes Rab3A to dissociate from synaptic membranes. *J Biol Chem*, 1997, **272** (33): 20857~ 20865
- 19 Jiang L J, Maret W, Vallee B. The ATP-metallothionein complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (16): 9146~ 9149

Growth Inhibitory Factor (GIF) Directly Interacts with G-protein Rab3a^{*}

KANG Qiao-Hua, CHEN Qiao-Lin¹⁾, REN Hong-Wei, RU Bing-Gen^{**}

(National Key Laboratory of Protein Engineering and Plant Gene Engineering, School of Life Sciences,
Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract Growth inhibitory factor (GIF), renamed as metallothionein-3, is a 68-amino acids brain specific member of the metallothionein family. GIF plays comprehensively physiologic roles and is deemed to be implicated in Alzheimer's disease. When supplemented with Alzheimer's brain extracts, GIF demonstrates its *in vitro* growth inhibitory activity on cultured neuron; but the underlying molecular mechanism remains unknown. To probe this mystery, the yeast two-hybrid system was employed to screen a human brain cDNA library for GIF-interacting proteins. From 4.1×10^6 transformants of library screening, a C-terminal fragment of small G-protein Rab3a was obtained, harboring 87 amino acids that interacted with GIF in yeast. The full-length Rab3a was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using human total placenta cDNA as template and concomitantly cloned. In yeast two-hybrid test, full-length Rab3a also interacted with GIF. Through coimmunoprecipitation and Western blotting experiments, interaction between GIF and Rab3a was confirmed in mammalian cell. Furthermore, the result indicated that Rab3a interacted with GIF in a GTP-binding form.

Key words growth inhibitory factor, Alzheimer's disease, yeast two-hybrid system, Rab3a, coimmunoprecipitation

^{*} This research was supported by a grant from the National 9th Five Years Plan Special Research Programs of China (96-C02-01-09).

¹⁾ College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009.

^{**} Corresponding author. Tel: 86-10-62751842, E-mail: Rulab@pku.edu.cn

Received: February 23, 2001 Accepted: June 18, 2001