

天然免疫系统新成员Akirin的研究进展

张晓妍 安利国 杨桂文*

(山东师范大学生命科学学院, 山东省动物抗性生物重点实验室, 济南 250014)

摘要 天然免疫系统是多细胞动物抵御细菌感染的第一道防线。Akirin是新近发现于果蝇中的天然免疫系统新成员,它在果蝇免疫缺陷(Imd)通路中发挥重要作用。Akirin同源基因广泛存在于从低等多细胞生物到高等脊椎动物中,进化上高度保守。已有的研究表明: Akirin在果蝇Imd通路和脊椎动物TLR通路下游,与NF- κ B家族转录因子形成复合物,参与调控免疫相关靶基因的转录,是天然免疫调控机制中不可或缺的转录因子,其过表达或缺失直接影响动物对细菌的防御能力。近年来, Akirin在相关信号通路中的功能研究取得重大进展。该文对Akirin的结构、参与天然免疫的分子调控机制以及基因进化等方面进行综述。

关键词 Akirin; 天然免疫; Imd信号通路; TLR信号通路; NF- κ B

天然免疫系统存在于所有多细胞动物中,尤其在低等多细胞动物中发挥重要作用^[1]。近几年,随着对免疫机制研究的深入,对天然免疫系统研究越来越受到广泛关注。2007年, Goto等^[2]通过对果蝇细胞进行功能性全基因组的RNAi筛选,寻找果蝇天然免疫系统的新成员。他们发现了CG8580基因,该基因编码一个由201个氨基酸残基组成的蛋白,参与到NF- κ B依赖的基因转录中。在果蝇中存在一个同源基因,小鼠中存在两个同源基因,其中,至少一个同源基因具有显著调节NF- κ B依赖的基因转录的功能。Goto等^[3,4]将这个家族命名为“*Akirins*”,日语中的意思是“把事情弄明白”,即需要深入研究的蛋白家族。随后,许多研究小组在其他多种动物中发现了Akirin同源蛋白,例如,在节肢动物蜚中发现的Subolesin^[5]、小鼠中的Mighty^[6]、大鼠中的FBII^[7]等,均为Akirin的同源蛋白。自发现以来, Akirin的功能及基因结构等方面的研究引发广泛关注,相继提出许多不同物种的Akirin序列,功能研究也越发深入。本文对Akirin基本结构以及在天然免疫调控中已取得的进展进行综述。

1 Akirin的结构

脊椎动物的Akirin家族包含两个成员(Akirin1、Akirin2),在不同物种中Akirin蛋白包含180~204个氨基酸残基。昆虫等低等动物则只含有一类Akirin分子且与高等动物的Akirin2同源性高。不同物种

的Akirin均具有较高的同源性,各物种Akirin蛋白都具有两个保守区,分别位于N末端和C末端,中间由一段低保守性的序列连接, N端24~29位为极其保守的KRRRC序列,是该蛋白的核定位信号(NLS),使Akirin严格定位于细胞核中发挥作用^[2,8,9]。Akirin没有DNA结合结构域,但Komiyama等^[7]在研究大鼠FBII(Akirin2)与14-3-3- β 蛋白的相互作用时发现该蛋白含有五个丝氨酸或苏氨酸磷酸化作用位点与14-3-3- β 结合,形成的复合物可作为一种MKP-1促进者的抑制剂发挥作用。说明Akirin可能通过与某类DNA结合蛋白互作,发挥转录调控作用。图1列出几种已知序列的Akirin蛋白,通过比对分析其一级结构。其中,斑马鱼和人类的Akirin1及Akirin2序列已明确,功能仍需深入研究。

2 Akirin在天然免疫系统中的调控作用

Akirin参与到天然免疫调控中,天然免疫系统在低等到高等生物中普遍存在。Akirin在不同动物的天然免疫调控中起重要作用,在果蝇等低等动物中Akirin参与Imd通路的调控,在小鼠等高等动物中则在TLR信号通路的调控中发挥作用^[2]。

收稿日期: 2010-12-30 接受日期: 2011-02-14

国家自然科学基金(No.30070586)和山东省高等学校科技计划(No. J10LC21)资助项目

*通讯作者。Tel: 0531-86180143, E-mail: yanggw@sdu.edu.cn

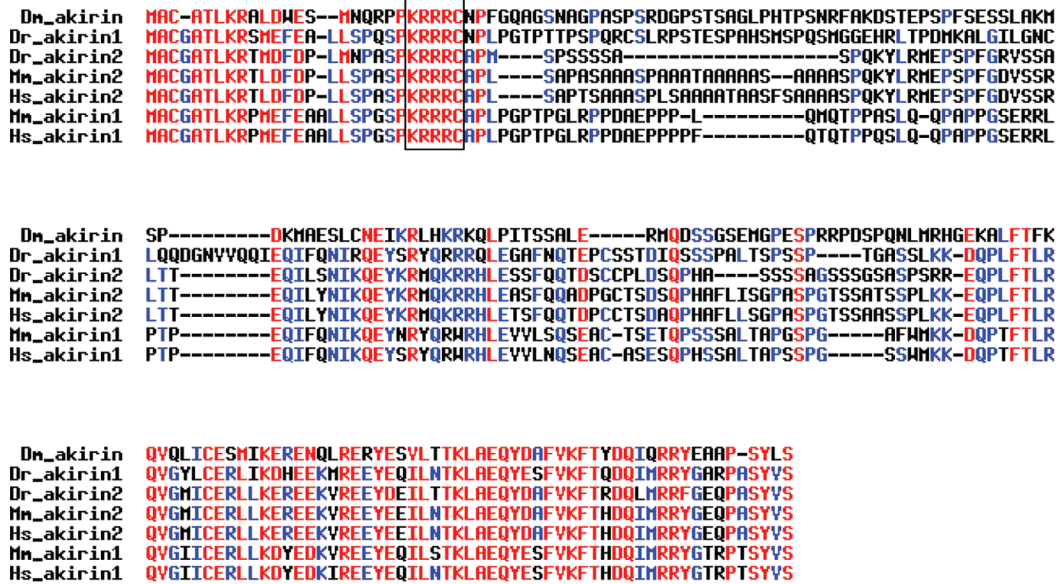


图1 Akirin氨基酸序列分析

利用Multalin(<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>)对几个物种Akirin蛋白氨基酸序列进行多序列比对, 同源性大于90%的序列用红色标记, 同源性介于50%~90%的序列用蓝色标记, 黑框标记为核定位信号(NLS)。Dm(黑腹果蝇, AY095189), Dr(斑马鱼, *akirin1* NP_001007186, *akirin2* NM_213542), Mm(小鼠, *akirin1* NM_023423, *akirin2* NM_001007589), Hs(智人, *akirin1* NP_078871, *akirin2* NP_060534)。

Fig.1 Amino acid alignment of Akirin sequences

Alignment of the Akirin sequences using MULTALIN(<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>). Residues conserved at 90% or more are marked in red, between 90% and 50% in blue. The putative NLS are marked in black box. Dm (*Drosophila melanogaster*, AY095189), Dr (*Danio rerio*, *akirin1* NP_001007186, *akirin2* NM_213542), Mm (*Mus musculus*, *akirin1* NM_023423, *akirin2* NM_001007589), Hs (*Homo sapiens*, *akirin1* NP_078871, *akirin2* NP_060534).

2.1 Akirin在果蝇Imd信号通路中的调控作用

昆虫的天然免疫机制是通过两条信号通路抵御细菌的感染。以黑腹果蝇为例, 它包含免疫缺陷(Imd)通路和Toll通路。真菌和革兰氏阳性细菌感染激活Toll通路, 革兰氏阴性细菌感染则激活Imd通路^[10]。而Akirin是Imd通路中不可缺少的调控因子。革兰氏阴性细菌感染时, 肽聚糖(PGN)结合到PGN识别蛋白(PGRP)上, 该蛋白是Imd通路的上游成分。Imd是一个具有死亡结构域(DD)的蛋白, 类似哺乳动物受体识别蛋白RIP, 其在NF- κ B的活化和凋亡中起重要作用^[11,12]。酵母双杂交实验和基因组分析确定该Imd蛋白死亡结构域招募接头蛋白FADD和caspase家族DREDD两种蛋白形成复合物^[13], 此复合物通过作用于TAK1结合蛋白TAB2, 进而激活果蝇TAK1^[14]。在TAB2的协助下形成由IRD5(IKK β 同源蛋白)和Kenny(IKK γ 同源蛋白)组成的IKK信号转导复合体。IRD5磷酸化Relish并将其切割为Ankyrin和REL两部分, REL进入细胞核, 在Akirin协助下促进抗菌肽等靶基因的转录。此通路可通过文献^[4]做适当修改, 如

图2A所示。Goto等^[2]证实, 利用RNAi介导的敲除策略降低果蝇Akirin表达量, 则通过Imd通路调控的抗菌肽表达量也显著降低, 果蝇对细菌的敏感性增强。此结果表明, 在果蝇Imd信号通路的调控中, Akirin是不可或缺的。但是对Akirin在核内的作用方式目前还不明确。现有的研究表明, Akirin在核内并不直接与REL相互作用, 因此推测二者是通过某个中间作用物相联系, 以复合体的形式发挥调控转录的作用^[15]。

2.2 Akirin2在哺乳动物TLR信号通路中的调控作用

哺乳动物中, 革兰氏阴性细菌感染激活TLR信号通路, 类似于果蝇Imd信号通路的激活。TLR即Toll样受体, 最早发现于果蝇体内, 可特异性地识别病原相关分子模式, 后来, 从低等到高等动物体内都发现TLR的存在^[16]。当TLR与配体结合时, 在膜内MyD88和IRAK被招募到受体处并作用于TRAF6, 进而激活TAK1, 随后形成的IKK复合体使I κ B在第二个丝氨酸处磷酸化^[17], 泛素化并被蛋白酶体降解,

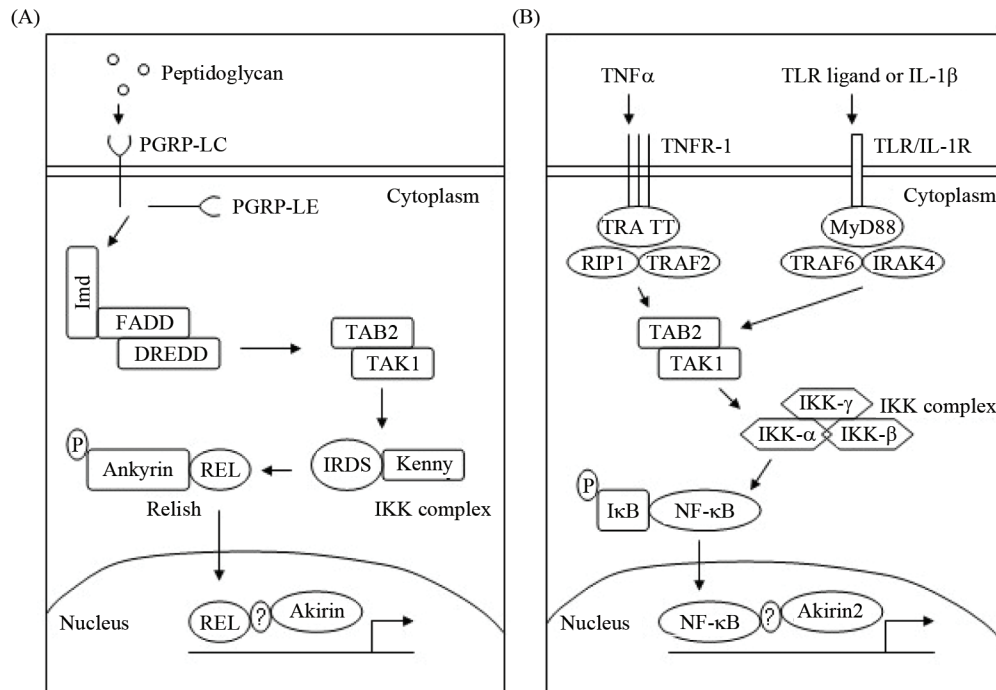


图2 Akirin蛋白在细菌感染后发挥免疫调节作用

A: 果蝇中, 革兰氏阴性细菌肽聚糖复合物激活Imd通路, 引发NF- κ B样转录因子REL转移至细胞核, 与Akirin等形成复合体, 调节编码抗菌肽等靶基因的转录。Akirin作为一个核蛋白在该信号通路下游发挥作用, 是REL调控基因转录所必需的; B: 哺乳动物中, 活化的TNF受体1(TNFR-1)、Toll样受体(TLR)和白介素-1受体(IL-1R)启动的信号通路导致NF- κ B移到细胞核中, 入核的NF- κ B通过某种中间作用物与Akirin2结合形成复合体形式, 结合DNA并激活相关基因的转录。小鼠Akirin2与果蝇Akirin高度同源, 是NF- κ B介导基因转录必需的。

Fig.2 Role of Akirin proteins in producing immune mediators following microbial infection

A: the *Drosophila melanogaster* Imd pathway. Peptidoglycan(PGN) components of Gram-negative bacteria activate the Imd pathway, which results in the movement of Relish (an NF- κ B-like transcription factor) to the nucleus. Relish then mediates transcription of genes that encode antimicrobial peptides. Akirin as a nuclear factor that acts late in this signaling cascade and is required for Relish-mediated gene transcription; B: the mammalian TNF and IL-1R-Toll-like receptor(TLR) signaling pathways. The activation of the TNF receptor 1 (TNFR-1), the IL-1R or Toll-like receptor turns on a signaling cascade that results in movement of NF- κ B to the nucleus and activation of gene transcription. In mice, a structurally highly conserved homologue of *Drosophila* Akirin, Akirin2, is required for NF- κ B-mediated gene transcription.

释放的NF- κ B转入核中定位, 启动细胞因子如IL-1、IL-6、IL-8、IL-12等靶基因的转录^[18,19](图2B)。与果蝇中Relish作用机制类似, 小鼠NF- κ B调控目的基因也需要Akirin的参与。敲除Akirin2基因的小鼠成纤维细胞在LPS等配体刺激后IL-6表达量较正常组显著下降, 而敲除Akirin1基因时没有明显变化^[2]。因此哺乳动物Akirin2在TLRs信号通路下游与NF- κ B共同作用参与免疫应答基因的转录。另外, 现有的结果没有显示Akirin与NF- κ B发生直接作用。因此, 推测Akirin是作为辅助因子, 通过与某种中间物质作用, 来调控或微调NF- κ B转录的激活^[4]。

3 Akirin基因的进化

进化分析表明, Akirin基因普遍存在于多细胞动物基因组中, 进化过程中该基因的出现早于植物、

微生物及动物的分化^[8]。最接近多细胞动物的原生动物的Akirin基因只含有3个外显子, 而较低等的腔肠动物的Akirin基因含4个外显子; 头索动物Akirin基因虽然具有5个外显子, 但外显子5仅仅是不翻译的核苷酸序列; 直到脊椎动物, Akirin1和Akirin2基因均由5个相似大小的外显子和4个较易变的内含子组成^[8,9](图3A)。扁盘动物Akirin基因外显子1/2的分界被保存至所有其他多细胞动物Akirin基因外显子1/2分界处; 另外, 扁盘动物Akirin基因外显子2/3的分界保存至腔肠/头索动物Akirin基因外显子2/3分界处及脊椎动物Akirin基因外显子3/4分界处; 而腔肠/头索动物Akirin基因的外显子2/3和3/4保存至脊椎动物Akirin1和Akirin2基因的外显子3/4和4/5分界处。从进化的角度分析, Akirin基因采用了最节俭的进化方案使某些保守的外显子-外显子分界得以保

留, 功能得以传递。首先, 在物种进化至分化出扁盘动物的过程之后 *Akirin* 基因发生了一个外显子的获得事件: 一个新的外显子插入到外显子3之后, 形成4个外显子3个内含子的基因结构。腔肠动物和头索动物 *Akirin* 基因均为此结构, 只是内含子的大小发生了一定的变化。在头索动物和后口动物分化之后, 一个内含子插入到后口动物 *Akirin* 基因外显子2中, 将原外显子2分为两个外显子, 从而形成了5个外显

子和4个内含子的基因结构^[8]。随后, 在硬骨鱼类的分化过程中发生了基因复制事件, *Akirin* 基因的重复导致 *Akirin* 家族成员的增多, 硬骨鱼中大多含2~3个 *Akirin* 家族成员, 而硬骨鱼中特殊的鲑鱼家族则发现有8个 *Akirin* 家族成员^[19,20]。鸟类退化为只含有一个 *Akirin* 蛋白, 其余的脊椎动物均含两个 *Akirin* 家族成员, 结构和功能都较为保守。进化过程根据文献^[8]做适当修改如下图所示(图3B)。

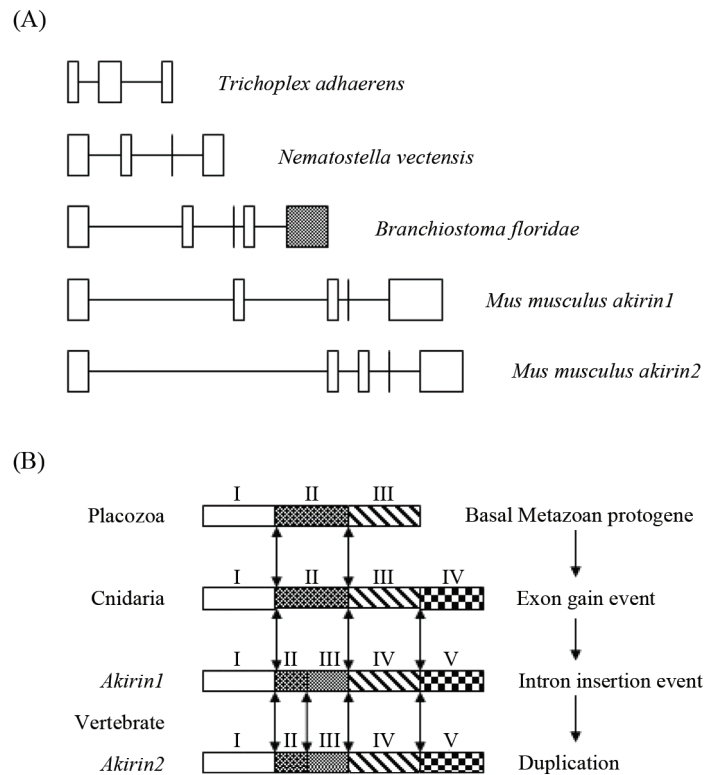


图3 真核生物 *Akirin* 直系同源基因的结构

A: *Akirin* 直系同源基因的结构。图中外显子用白色方块表示, 内含子用黑色横线表示。多细胞动物 *Akirin* 直系同源基因起源于领鞭虫基因外显子2/3, 头索动物 *Akirin* 基因由5个外显子组成, 其外显子5用阴影方块表示以显示它与脊椎动物外显子5不同; B: 多细胞动物保守的外显子-外显子边界。不同颜色方块表示相邻外显子并用罗马数字标号, 双箭头表示保守的外显子-外显子界线。

Fig.3 The genomic organisation of *Akirin* orthologues across eukaryotic lineages

A: the schematic diagram is made to scale with exons as white boxes and introns as black lines. Evidence is also presented suggesting that the coding sequence of the metazoan *akirin* proto-orthologue was derived from exons 2/3 of the choanoflagellate (*M. brevicollis*) gene. *B. floridae Akirin* is composed of 5 exons and exon 5 is shaded with vertical lines to show that it is not equivalent to exon 5 of vertebrate *Akirins*; B: shows the conservation of exon-exon boundaries across the metazoans. Different exons are shaded in different colours and are numbered with roman numerals. Exons are not to scale and represent an archetypal genomic organization for the taxa shown. Double ended-arrows indicate conservation of exon-exon boundaries.

4 总结与展望

Akirin 作为新近发现的调控因子, 其功能研究进展迅速。现已发现 *Akirin* 可参与天然免疫、胚胎发育以及肌肉再生等过程。在天然免疫应答中,

Akirin 作为下游调控因子通过与某种中间物质相互作用调控 NF- κ B 信号通路, 从而调节目标基因的转录。昆虫及脊椎动物的胚胎发育也需要 *Akirin* 的参与, Goto 等^[2] 构建的 *Akirin2* 敲除果蝇及 *Akirin2* 敲除

小鼠均无法完成正常的胚胎发育过程,说明Akirin2是昆虫及哺乳动物胚胎发育所必需的。哺乳动物中Akirin1在肌肉再生过程中发挥重要作用,研究发现小鼠Akirin1表现为前肌原性细胞因子,在肌肉再生早期(2天)大量表达,实验证实卫星细胞的活化和迁移需Akirin1参与,炎症细胞趋化性的增强也需Akirin1参与,炎症细胞趋化性的增强也需Akirin1参与到PI3-K信号通路形成高效板状伪足形式来实现^[6,21]。由此可知,Akirin是一类功能多样的调控因子。尽管如此,对Akirin功能及其作用机理研究仍有许多未知的问题,如Akirin与何种中间辅助因子相互作用,如何发挥基因转录的调控作用等问题仍需探究。相信对Akirin的进一步研究有助于我们对基因转录调控机理的深入了解。

参考文献(References)

- 1 Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124(4): 783-801.
- 2 Goto A, Matsushita K, Gesellchen V, Chamy L, Kutteneuler D, Takeuchi O, *et al.* Akirins are highly conserved nuclear proteins required for NF- κ B-dependent gene expression in *Drosophila* and mice. *Nat Immunol* 2008; 9(1): 97-104.
- 3 Fayyaz S, Richard A. Immunology: Cascade into clarity. *Nature* 2008; 451: 254-5.
- 4 Bruce B, Moresco EM. Akirins versus infection. *Nat Immunol* 2008; 9(1): 7-9.
- 5 Galindo RC, Doncel-Perez E, Zivkovic Z, Naranjo V, Gortazar C, Mangold AJ, *et al.* Tick subolesin is an ortholog of the akirins described in insects and vertebrates. *Dev Comp Immunol* 2009; 33(7): 612-7.
- 6 Salerno MS, Dyer K, Bracegirdle J, Platt L, Thomas M, Siriatt V, *et al.* Akirin1(Mighty), a novel promyogenic factor regulates muscle regeneration and cell chemotaxis. *Exp Cell Res* 2009; 315(12): 2012-21.
- 7 Komiya Y, Kurabe N, Katagiri K, Ogawa M, Sugiyama A, Kawasaki Y, *et al.* A novel binding factor of 14-3-3 β functions as a transcriptional repressor and promotes anchorage-independent growth, tumorigenicity and metastasis. *J Biol Chem* 2008; 283(27): 18753-64.
- 8 Macqueen DJ, Johnston IA. Evolution of the multifaceted eukaryotic akirin gene family. *BMC Evol Biol* 2009; 9: 34-54.
- 9 Macqueen DJ, Dristjansson BK, Johnston IA. Salmonid genomes have a remarkably expanded akirin family, coexpressed with genes from conserved pathways governing skeletal muscle growth and catabolism. *Physiol Genomics* 2010; 42(1): 134-48.
- 10 Brennan CA, Anderson KV. *Drosophila*: The genetics of innate immune recognition and response. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 457-83.
- 11 Gottar M, Gobert V, Michel T, Belvin M, Duyk G, Hoffmann JA, *et al.* The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature* 2002; 416(6881): 640-4.
- 12 Georgel P, Naitza S, Kappler C, Ferrandon D, Zachary D, Swimmer C, *et al.* *Drosophila* immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. *Dev Cell* 2001; 1(4): 503-14.
- 13 Leulier F, Rodriguez A, Khush RS, Abrama JM, Lemaitre B. The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist gram-negative bacterial infection. *EMBO Rep* 2000; 1(4): 353-8.
- 14 Naitza S, Rosse C, Kappler C, Georgel P, Belvin M, Gubb D, *et al.* The *Drosophila* immune defense against gram-negative infection requires the death protein dFADD. *Immunity* 2002; 17(5): 575-81.
- 15 Lu Y, Wu LP, Anderson KV. The antibacterial arm of the *Drosophila* innate immune response requires an I κ B kinase. *Genes Dev* 2001; 15(1): 104-10.
- 16 Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood* 2009; 113(7): 1399-406.
- 17 Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, *et al.* Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2001; 103(2): 351-61.
- 18 Wang C, Deng L, Hong H, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001; 412(6844): 346-51.
- 19 Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(11): 837-48.
- 20 Macqueen DJ, Bower NI, Johnston IA. Positioning the expanded akirin gene family of Atlantic salmon within the transcriptional networks of myogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 400(4): 599-605.
- 21 Marshall A, Salerno MS, Thomas M, Davies T, Berry C, Dyer K, *et al.* Mighty is a novel promyogenic factor in skeletal myogenesis. *Exp Cell Res* 2008; 314(5): 1013-29.

Akirin, the New Molecule in Innate Immune System

Xiao-Yan Zhang, Li-Guo An, Gui-Wen Yang*

(Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Resistance Biology, School of Life Sciences,
Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract The innate immune system is the first defense against the microorganisms in all metazoans. Akirin, as a new nuclear factor which discovered in the innate immune response of *Drosophila melanogaster*, plays a critical role in the immune deficiency (Imd) pathway. Akirin proto-orthologue gene exists in a wide range of metazoans from Choanoflagellates, *Drosophila* to mammals and its sequences are highly conserved. In the Imd pathway of *Drosophila* and the Toll pathway of vertebrates, Akirin combining with the transcription factor NF- κ B can modulate the transcription of target genes. Besides, Akirin's overexpression and knockout influence animals' defense ability against bacteria. Recently, some progress has been made in the immune-related signaling pathway of Akirin. This article will summarize its structure, function, regulatory mechanisms and evolution.

Key words Akirin; innate immune system; Imd pathway; TLR pathway; NF- κ B

Received: December 30, 2010 Accepted: February 14, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30070586) and Foundation for University by Educational Commission of Shandong Province (No.J10LC21)

*Corresponding author. Tel: 86-531-86180143, E-mail: yanggw@sdu.edu.cn