

负调控元件——沉默子^①

陈 妍 王金发

(中山大学生物系, 广州 510275)

Negative Regulatory Element——Silencer

CHEN Yan WANG Jinfa

(Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

转录水平的调控是基因表达调控的主要方式, 在该过程中, 除了由增强子和某些响应诱导信号的正调控元件介导的正调控外, 还包括由负调控元件完成的基因表达的阻遏。沉默子 (silencer) 是近年来发现的一种负调控元件, 在真核基因的表达调控中发挥了重要的作用。本文总结了目前关于沉默子本质、特征及沉默子的作用机理和模型的一些研究结果。

1 沉默子的发现和特性

与增强子相同, 沉默子也是参与调节基因表达正确时空模式的顺式作用元件。酿酒酵母沉默接合型座位沉默子是最早发现也是研究最多的沉默子^(3,5)。单倍体酿酒酵母有 a 和 α 两种接合型, 由染色体 III 上 MAT 座位中的基因控制: 当该座位是 MAT α 时, 接合型是 α ; 当该座位是 MATa 时, 接合型为 a。与接合型有关的遗传信息也存在于 MAT 座位左右两侧的 HML α 和 HMRA 座位中 (图 1)。虽然这两个座位分别含有 α 和 a 基因的完整拷贝及它们各自的启动子, 但通常保持沉默不被转录, 这对于单倍体酵母表现出正常的接合行为是必要的, 否则将导致不育。已发现至少有 4 种蛋白, SIR1~4 (Silent-Information Regulator), 是阻遏 HML 和 HMR 表达的反式因子。此外, 阻遏也需要 HML α 和 HMRA 座位两侧的位点。当这些位点与检测基因相连时可阻遏基因的表达, 而且与增强子相似⁽⁸⁾, 有着一些特殊的性质: (1) 这些位点可以在远距离作用于顺式连接的启动子, (2) 位点对基因的阻遏作用没有方向的限制, 即无论其位于启动子的上游或下游均可阻遏启动子的表达, 故命名为沉默子。

随着酵母沉默子的发现和鉴定, 在真核生物、原核生物和病毒中都发现了沉默子的存在^(10,11,17,21), 这表明, 沉默子在基因调控中有着重要的作用。

2 沉默子的组件结构 (modularity)

在对某些沉默子的研究中, 发现沉默子与增强子相似, 在结构上是复合的^(2,4,6,14,19), 也就是说, 沉默子是由多个遗传元件或称组件 (module) 构成, 不同的组件和特异蛋白因子结合后协同产生复杂的阻遏模式。

对最早发现的酵母 HMR-E 沉默子进行突变体研究, 分析了沉默子的组件构成及相互之间的联系^(4,9)。在 HMR-E 中, 至少含 3 个与沉默子功能有关的组件 A、E、B, 这 3 个组件互相协同阻遏转录。每个组件都是蛋白因子的结合位点: 其中组件 E、B 分别与细胞内两种高丰度蛋白 RAP1 (repressor-activator binding protein) 和 ABFI (ARS-binding factor) 结合, 但 ABFI 和 RAP1 与其它的元件结合时通常是做为转录激活蛋白存在;

^①国家自然科学基金资助项目, 批准号39370402。

A 组件中含有 11bp 的 ARS (Autonomous replication sequence) 保守序列, TTTTATATTTA, 与蛋白 ACBP 结合, ACBP 除与 HMR-E 中的 A 组件结合外, 还可与许多 ARS 元件结合。这 3 个组件单独都不能行使阻遏功能: E、B 组件均促进转录, A 组件则可起始质粒自主复制, 三者只有互相协同才可阻遏转录。但野生型 HMR-E 中的组件就沉默功能而言又是冗余的: 单独一个组件的突变对于沉默子的阻遏作用基本无影响, 而三者中任意两个同时突变均会引起阻遏作用的完全丧失, 即在 HMR-E 沉默子中至少有两个组件共同作用才可阻遏基因的转录。

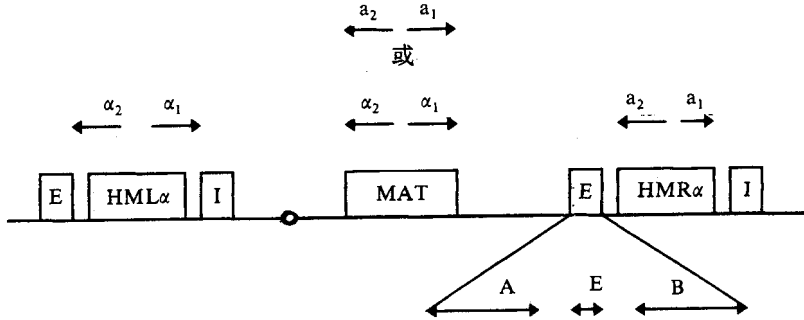


图 1 酵母沉默接合型座位和有关沉默子的组成
图中所示为染色体 III 和其上含接合型基因的 3 个染色体座位 HML、MAT 和 HMR。HMR 和 HML 座位两侧为沉默所需的 E 和 I 沉默子。在沉默子 HMR-E 中, B、E 和 A 分别代表 ABF1、RAPI 结合位点和 ARS 保守序列。

别的沉默子中也发现类似的结构。在鸡溶菌酶基因的转录起始位点上游有一组织特异性沉默子 S-2.4⁽²²⁾, 根据足迹试验和凝胶阻滞分析结果, 该沉默子内有两个核蛋白因子结合位点 F₁ 和 F₂。F₁ 按非组织特异性方式结合一种尚未纯化定性的蛋白因子 Nep1 (negative protein 1); F₂ 则表现出组织特异性的蛋白结合活性。这两个组件单独都能起阻遏作用, 不过单个组件形成的沉默子沉默功能较弱, 完整的沉默功能在两个组件协同下完成。这种协同作用可能是由于蛋白与 DNA 的亲合性增强, 也可能是由于两者功能上的协同。虽然酵母沉默子和鸡溶菌酶沉默子都可分解为更小的组件, 但酵母沉默子的组件本身并无沉默子活性, 这与鸡溶菌酶沉默子有所不同。可能不同的组件对于沉默作用的贡献并不相同, 有的决定沉默作用的强弱, 有的决定作用方式的特异性, 只有几个组件协同作用, 才能完成有沉默子特点的阻遏。

3 沉默子的作用机理和模型

3.1 复制与沉默

在真核基因组的复制中, 常有转录调控元件的参与。对沉默子的研究发现沉默子作为调控元件的一种, 也与复制有一定的联系: (1) 人类 Alu 家族中的大部分成员都有一保守的蛋白结合位点, GGAGGC。将含该结合位点的片段插入含 MRE (c-myc 基因的上游调控元件) 和 SV40 启动子的报告系统, 该片段不仅可阻遏 MRE 对转录的增强作用, 还可阻遏 MRE 中 ARS 的活性, 这表明该序列参与了对转录和复制的调控⁽²⁰⁾; (2) 在含多瘤病毒复制起点的质粒中插入鼠 DNA 聚合酶 β 基因中的两个沉默子后, 质粒的转录和复制都受到阻遏⁽²²⁾。

沉默子参与对复制的调控, 可以简单地解释为复制和沉默分享了同一序列元件, 但对酵母沉默子的研究却提示复制与由沉默子介导的沉默有关。首先, 在 HMR 和 HML 的 E 和 I 沉默子中都含有具有自主复制活性的 ARS 保守序列, 在真核生物基因组中 ARS 保守序列出现并不频繁, 平均每 40kb 才有一个 ARS 序列, 所以这种自主复制活性与沉默子的联系看来并不是巧合, 很可能在沉默子处开始的复制对于沉默有一定的作用⁽⁹⁾; 其次, Miller 和 Nasymth⁽¹²⁾ 等发现当由沉默子介导的阻遏被破坏后, 细胞只有经过 S 期方可重新建立阻遏; 这

样, S 期中的某项活动, 很可能是 DNA 的复制, 对于转录阻遏极为必要。酵母中 SIR 突变只能使沉默接合型座位中沉默状态丧失但并不影响其复制起始的能力, 由此可以推测很可能是复制起始影响了沉默^[14]; 在沉默子处形成的复制复合体中有可形成特定染色质结构的因子, 而这种染色质结构的形成是沉默作用所必需的; 也可能是由于真核基因复制时在复制起点处产生一特殊结构, 沉默子位于该结构中阻止附近基因的转录。也有人提出沉默依赖于复制可能是由于起始于沉默子的 DNA 复制有利于沉默子座位上转录失活 DNA 环的形成^[5]。

3.2 沉默子的作用模型

在已发现的沉默子元件中大多数的作用方式与位置和方向无关, 但也有某些沉默子对位置与方向表现出不同程度的敏感性^[10, 14, 23]。此外, 不同的沉默子元件作用方式还存在一些别的差异: 有的沉默子的作用方式具有组织特异性^[2], 有些则是非特异性的^[10]; 大多数沉默子的作用是非启动子特异性的, 也有少数的作用范围只限于其同源启动子^[23]; 有的沉默子直接阻遏启动子的转录, 有的沉默子对启动子的阻遏依赖于增强子^[14, 15]。关于沉默子的作用模型, 目前有以下几种假设:

(1) 沉默子介导产生的沉默是一种状态的变化, 在此过程中, 产生类似于异染色质的结构阻止转录因子与 DNA 的相互作用, 使转录被抑制。沉默子作为异染色质形成中的失活中心参与沉默状态的建立和扩散 (emanating)^[17, 18]。

(2) 沉默子含阻遏蛋白结合序列, 阻遏蛋白与其结合后阻遏基因的转录^[7, 17]。在这种情况下, 可有几种模型来解释随后产生的阻遏^[13]: ①直接阻遏 (direct repression), 沉默子结合蛋白与转录复合物中的成员结合后将其固定, 使基础转录复合物无法形成而丧失活性; ②竞争 (competition), 在一些基因中沉默子与增强子等正调控元件相邻或相重叠, 阻遏蛋白结合后阻止激活蛋白与邻近正调控元件的结合从而阻遏转录; ③淬灭 (quenching), 沉默子与增强子相邻, 阻遏蛋白与沉默子结合后, 虽不影响激活蛋白与 DNA 的结合能力, 却通过蛋白之间的相互作用阻止激活蛋白与转录复合物的正确接触来抑制其活性。

(3) 某些沉默子中含有骨架结合位点保守序列; HMR-E 沉默子的结合蛋白 RAP1 是核骨架蛋白的重要成分, 对于染色体成环是必要的, 很可能有的沉默子是通过与核基质相互作用降低转录水平^[7]。与增强子相似, 提出了环出模型 (looping)^[24]: 沉默子与蛋白结合, 通过蛋白之间的相互作用形成 DNA 环后与启动子作用破坏起始复合物而抑制转录; 或者产生的 DNA 环发生了组蛋白的修饰和拓扑结构的变化, 这种变化使关键的转录因子不能正确结合从而阻止转录。也可能沉默子和核基质相互作用将转录单元固定于缺乏转录因子的亚显微结构区^[22]。

4 结 语

近年来, 随着对基因转录调控研究的深入, 人们对负调控的认识也越来越深刻: 生物为适应复杂的外界环境和自身发育的需要所进行的调控不是单纯的正调控所能完成, 必需有精细的负调控机制来帮助实现^[1]。首先, 就进化来说, 由于基因的活性是依赖于所有调控元件调节效果的总和, 所以负调控元件与其它调控区域一起, 使基因的活性适应新环境; 此外, 由观察到的负调控元件可有效阻遏弱转录单元但对于强增强子的负控作用却非常微弱的特性, 可以推想负调控在组织特异性和可诱导的基因表达中起作用: (1) 当组织中相关基因需被关闭时, 负调控负责基因的完全失活; (2) 在有基因被诱导的组织中, 移去诱导物后基因表达的快速下降也是由于负调控元件对于活性正在减弱的增强子的阻遏作用加强。

对沉默子的研究表明, 沉默子与增强子一样, 都在基因转录调控中起着重要作用。沉默子也是通过与蛋白因子的结合来完成对基因转录的调节。沉默子结合蛋白的特性是复杂的, 有的结合蛋白不仅与沉默子结合起阻遏作用, 而且可与正调控元件结合增强转录; 还有实验表明一个沉默子可因其结合蛋白的改变而行使增强功能。因此, 对沉默子结合蛋白及沉默子-蛋白相互作用的研究必将有助于进一步理解基因表达的调控机理。

参 考 文 献

- 1 Baniahmad A *et al.* Activity of two different silencer elements of the chicken lysozyme gene can be compensated by enhancer elements. *EMBO J.*, 1987, 6: 2297~2303
- 2 Baniahmad A *et al.* Modular Structure of a Chicken Lysozyme Silencer: Involvement of an unusual Thyroid Hormone Receptor Binding Site. *Cell*, 1990, 61: 505~514
- 3 Brand A H *et al.* Characterization of a "Silencer" in Yeast: A DNA Sequence with Properties Opposite to Those of a Transcriptional Enhancer. *Cell*, 1985, 41: 41~48
- 4 Brand A H *et al.* A Yeast Silencer Contains Sequence That Can Promote Autonomous Plasmid Replication and Transcriptional Activation. *Cell*, 1987, 51: 709~719
- 5 Buchman A R *et al.* Two DNA-binding Factors Recognize Specific Sequences at Silencers, Upstream Activating Sequences, Autonomously Replicating Sequences, and Telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, 8: 210~225
- 6 Dynan W S. Modularity in Promoters and Enhancers. *Cell*, 1989, 58: 1~4
- 7 Franncy A J M *et al.* Identification of two silencers flanking an AP-1 enhancer in the vimentin Promoter. *Gene*, 1992, 122: 337~343
- 8 Khoury G *et al.* Enhancer Elements. *Cell*, 1983, 33: 313~314
- 9 Laurenson P *et al.* Silencers, Silencing and Heterizable Transcriptional States. *Microbiol. Rev.*, 1992, 56: 543~560
- 10 Lin B *et al.* Repression of Platelet-derived Growth Factor A-chain Gene Transcription by an Upstream Silencer Element. *J. Bio. Chem.*, 1996, 271: 26281~26290
- 11 Mieda M *et al.* Promoter Region of the Rat m4 Muscarinic Acetylcholine Receptor Gene Contains a Cell Type-specific Silencer Element. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271: 5177~5182
- 12 Miller A M, Nasmyth K A. Role of DNA replication in the repression of silent mating type loci in yeast. *Nature*, 1984, 312: 247
- 13 Nourbakhsh M *et al.* Interferon- β promoters contain a DNA element that acts as a position-independent silencer on the NF- κ B sites. *EMBO J.*, 1993, 12: 451~459
- 14 Pierce J W *et al.* Silencing of the Expression of the Immunoglobulin Kappa Gene in Non-B Cells. *Mol. Cell. Biol.*, 1991, 11: 1431~1437
- 15 Rivier D H *et al.* An Origin of DNA Replication and a Transcription Silencer Require a Common Element. *Science*, 1992, 256: 659~663
- 16 Savagner P *et al.* Two Silencers Regulate the Tissue-specific Expression of the Collagen-II Gene. *J. Bio. Chem.*, 1990, 265: 6669~6674
- 17 Schnetz K. Silencing of *E. coli* *bgl* Promoter by flanking sequence elements. *EMBO J.*, 1995, 14: 2545~2550
- 18 Shei G J *et al.* Yeast Silencers Can Act as Orientation-Dependent Gene Inactivation Centers That Respond to Environmental Signals. *Mol. Cell. Biol.*, 1995, 15: 3496~3506
- 19 Targa F E *et al.* Preliminary Characterization of a nuclear factor interacting with the silencer element at the 3'-side of the chicken α -globin gene domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, 188: 416~423
- 20 Tomilin N V *et al.* Transcription and replication silencer element is present within conserved region of human Alu repeats interacting with nuclear protein. *FEBS Lett.*, 1990, 263: 69~72
- 21 Wang J F *et al.* Identification of a promoter and a Silencer at the 3'-end of the first intron of the human Aromatase Gene. *Mol. Endocrinology*, 1992, 6: 1479~1488
- 22 Yamaguchi M *et al.* Repression of Polyoma Virus DNA Replication by 5'-flanking region mouse DNA polymerase β gene containing transcriptional silencer elements. *J. Bio. Chem.*, 1989, 264: 16887~16891
- 23 Ye J P *et al.* Characterization of a silencer regulatory element in the human interferon- γ promoter. *J. Bio. Chem.*, 1994, 269: 25728~25724.
- 24 Yuko W K *et al.* The ϵ -globin gene silencer. *J. Bio. Chem.*, 1992, 267: 1152~1158

1996-12-30 收稿, 1997-06-09 修回.

《天然产物研究与开发》由中国科学院成都分院等单位合办, 国内统一刊号: CN 51-1335/Q. 主要内容包括植物、动物生物高分子等天然产物(特别是天然药物)的资源分布、鉴定、分析、提取、改性、仿生和利用。1989年创刊。本刊征求有关天然产物研究与开发的来稿, 并欢迎订阅。邮发代号: 62-107。每本 10 元, 全年 40 元。

地址: 610041 成都: 中国科学院成都文献情报中心《天然产物研究与开发》编辑部, 电话: (028)5210304。