

Toll受体及其配体 Spatzle研究进展

于 淼 侯 林

(辽宁师范大学海洋重点实验室, 辽宁大连 116029)

摘 要: Toll是一种与脊椎动物白介素-1受体同源的一种跨膜蛋白,它的首次发现是在果蝇胚胎发育背腹轴分化过程中的作用。同时 Toll作为一种病原识别受体,在固有免疫中通过对病原体相关的分子模式的识别发挥作用,通过刺激信号的级联反应导致细胞因子的产生和协同刺激因子的表达。Spatzle作为无脊椎动物发育中的神经生长样信号传导因子新家族中的一员,是 Toll的重要配体,在这两条通路中,通过不同的激活途径与 Toll结合,诱导信号的产生。

关键词: Toll; Spatzle;背腹轴分化;先天性免疫

中图分类号 Q816 **文献标识码** A **文章编号** 1007-7731(2010)07-48-03

1 Toll通路相关研究进展

1980年,生物学家 Nüsslein-Volhard在研究黑腹果蝇的过程中发现了一种突变基因导致果蝇的胚胎发育发生变化,首次有了“Toll”这一概念。Toll是一种跨膜蛋白,与脊椎动物的白细胞介素-1(L1)的受体同源。随后在哺乳动物中发现了相似的蛋白,研究表明其不仅在发生学上有价值,在免疫学上也有重要的意义。此后,共有11种Toll的同源物相继被鉴定(TLR1~TLR11),对相关的分子结构,各个受体的特异性配体,受体与配体之间的识别,以及其信号转导通路都有了不同程度的了解。

1.1 Toll通路参与调节果蝇胚胎发育 腹部结构发育需要11个母体效应基因,它们的产物在受精到产生细胞囊胚层期间建立了背-腹轴。dorsal系统对腹部结构包括中胚层和神经外胚层的发育是必需的,由于这个系统的突变效应是“背部化”而非“腹部化”,所以如此命名。dorsal组群中的很多基因的突变将会导致缺少腹部结构,并且在腹侧出现背部结构。但是在突变体胚胎中注射野生型的细胞质就会弥补缺陷从而使腹部结构能够正常发育。腹部决定途径的信号在卵周隙中导致发生卵裂和一系列的蛋白水解剪切。可能由snake的产物剪切easter的产物,easter的产物剪切spatzle的产物,依次被激活。Spatzle被剪切激活后,能为Toll基因编码的受体提供配体,Toll是在卵母细胞中起作用的该途径中的第一个组分^[1]。

挽救实验证明,Toll是一个把信号传递到卵母细胞中的极其重要的基因。Toll突变会导致失去背-腹梯度,但注射Toll这后又可恢复背-腹结构的形成。Toll是一种与脊椎动物白介素-1受体同源的一种跨膜蛋白,与配体结合之后可以充分激活腹侧发育途径。这一反应发生在卵周隙的腹侧空间,spatzle作为其配体,分布不能离剪切位点扩散的太远,它会非常迅速的结合到Toll上,但胚胎

腹侧的Toll被激活。之后Toll通过激活tube和pelle起作用^[2]。Tube可能是一个衔接蛋白,pelle编码一种激酶,可能导致cactus的产物磷酸化,cactus又是dorsal编码的转录作用因子的调节物。

dorsal和cactus形成一对相互作用的蛋白对,它们与转录因子NF- κ B及其调控因子I- κ B相关联。NF- κ B包括两个亚基,它们被I- κ B限定在胞质中,当I- κ B发生磷酸化时释放出NF- κ B,进入细胞核,在细胞核中它作为启动子中含有 κ B模序的转录因子。Cactus调节dorsal的方式也和I- κ B调控NF- κ B的方式相似,即cactus-dorsal复合物在细胞质中是无活性的,但是当cactus磷酸化后就会释放出dorsal蛋白,进入细胞核。由于L1受体的激活对于NF- κ B的激活有主要作用,Toll的激活又会引起dorsal的激活,因此该途径可以由受体转移到效应物^[3]。Toll激活的结果使胚胎由腹部到背部在细胞核中形成一个dorsal蛋白的梯度。在腹侧,dorsal蛋白释放到细胞核中,但在背侧dorsal蛋白保留在细胞质中。在合胞体阶段,形成一个陡峭的轴性梯度,并在细胞囊胚层阶段变得更加陡峭。Dorsal蛋白的特点是只分布在腹背,形成一个具有dorsal的核与腹部形成的一致性。dorsal蛋白在胚胎中的总量不变,轴性梯度仅仅是通过细胞核和细胞质中蛋白质的重新分布建立的。Dorsal可以激活也可以抑制基因表达。Dorsal激活twist和snail基因,它们在腹部结构发育中是必需的。Dorsal抑制基因dpp和zen基因,它们在背部结构发育中是必需的^[4]。

1.2 Toll受体介导果蝇天然免疫信号传递系统 果蝇不具有获得性免疫系统,它们依赖于天然免疫机制来保护自己不受感染。感染之后,昆虫启动一个快速的非特异性的免疫应答。昆虫的这种抗微生物应答与哺乳动物的先天性免疫应答相似。免疫识别系统的识别受体具有多样性,

作者简介:于淼(1985-),女,吉林德惠人,学生,主要从事海洋生物学、昆虫早期胚胎发育相关基因研究。 收稿日期:2010-03-08

并且特异的识别病原体联合分子像脂多糖和肽聚糖。Toll受体被认为是这一信号转导系统中的一个重要成分, Toll是一类跨膜受体, 可分为胞外区、跨膜区和胞内区 3个部分。昆虫和哺乳动物中的 Toll和 TLRs是一个保守的识别受体家族。Toll受体家族对于免疫应答是必需的, 但是对于受体与微生物及母体配体的相互作用尚不清楚^[5]。

Toll是在抗真菌及抗革兰氏阳性菌的应答中诱导昆虫抗微生物肽表达必需的。抗革兰氏阴性菌的应答反应调节依赖于第二条通路, 被称为 MD途径, 这条途径控制另外一些抗微生物肽的表达。这两条途径所诱导表达出的抗微生物肽对于果蝇应对微生物感染是非常关键的。Toll受体将感染的信号跨膜传导的机制尚不清楚。果蝇先天性免疫应答中的 Toll途径的许多组份已经被鉴定。细胞外的组份包括一个肽聚糖识别蛋白(PGRP-SA), 一个丝氨酸蛋白酶(Persephone), 一个丝氨酸蛋白酶抑制剂(Necrotic), 和一个被推测的配体(Spatzle)。细胞内的组份包括两个接头蛋白(MyD88 and Tube), 一个激酶(Pelle), 和一个转录因子(Dif)^[6]。

在 Toll通路受到革兰氏阳性菌肽聚糖刺激后, 通过细胞外的肽聚糖识别受体(PGRP-SA)来调节。编码果蝇PGRPs的共有 12个基因, 外加一些连接亚基。这些PGRPs被归为短家族(像-SA, -SB, -SC和-SD, 一些短的转录本和5非编码区)和长家族(像-LA, LB, LC, LD和LE, 长的转录本和长的5非编码区)。另外一种对模式识别蛋白的解释可能是难以理解的, 阴性菌识别蛋白GNBP-1的结合可能需要上游阳性菌的识别。高水平表达的SA和GNBP-1是同时发生的, 而不是独立的启动Toll途径。这些研究共同表明革兰氏阳性菌结合分子被多种母体蛋白所识别, 随后将协同刺激Toll途径。真菌刺激途径不依赖SA, SD或GNBP-1, 而是一种丝氨酸蛋白酶, PERSEPHONE, 和一种蛋白酶抑制剂, NECROTIC^[7]。

感染实验发现, 受到感染后果蝇细胞中的 Rel蛋白激酶启动了 Spatzle的合成, Spatzle是果蝇跨膜受体 Toll的一个配体, 当其与 Toll结合之后能够引起胞内两个蛋白 Tube和 Pelle活化。其中, Pelle属于丝氨酸/苏氨酸天然免疫激酶, 而 Tube是一个接头分子, Tube可使 Pelle活化, 导致一个新的丝氨酸/苏氨酸蛋白酶-肿瘤坏死因子受体相关因子(dTRAF)活化。dTRAF活化之后可介导 Cactus的磷酸化, 导致 Cactus-Dorsal复合物的解离, 使 Dorsal被释放出来并使转核信号产生, 激活靶基因的转录。Cactus和 Dorsal是与哺乳动物 I κ B和 NF- κ B相对应的分子。另一个和 NF- κ B功能相似的果蝇 Rel家族蛋白是 Dif, 它在感染后被激活, 是天然免疫系统的信号分子。研究指出, Dorsal与 Dif转录因子和 DNA的结合, 启动抗真菌蛋白果蝇毒素的合成。而果蝇 Rel家族的第三个成员 Relish是一种参与抗细菌途径的信号分子。Rel家族不同分子

在抗真菌与抗细菌上的效应差异, 反映了 Toll/Rel信号系统的精密性和有效性^[8]。

2 Spatzle基因相关研究进展

Spatzle基因是提供果蝇胚胎背腹轴发育固有的特殊的位置信息所必需的并且诱导真菌的先天性免疫应答。Spatzle蛋白的 C末端多肽是一个由二硫键连接的多聚体模型, 这表示这个多肽碎片的核心二硫键及二聚体排列与脊椎动物的神经生长因子高度相似。因此, 可以说 Spatzle是无脊椎动物发育中的神经生长样信号传导因子新家族中的一个成员。在背腹轴的发育模式当中, 最广泛的被接受的观点将 Spatzle定位于该通路腹侧的限制性蛋白酶级联反应的最末端, 这导致 Spatzle的前体被蛋白酶水解成有活性的配体, 该配体被认为会与 Toll受体结合。在成体的果蝇当中, Spatzle前体的加工及 Toll途径的活化, 诱导产生免疫蛋白, 如抗微生物多肽。具有相似发夹结构的丝氨酸蛋白酶 snake和 easter, persephone和 spatzle processing enzyme是这一反应的酶网络的组成元件^[9]。

通过对 *Bombyx mori* 的 Spatzle基因的研究发现, 该基因由 1289个碱基组成的系列包含了一个 834个碱基的开放阅读框, 编码 277个氨基酸残基。比较 cDNA和支架结构发现外显子结构与基因组序列的装配组成相关。该基因有 6个外显子和 5个内含子, 外显子 2有两个克隆定位在 13, 905-14, 140和 24, 054-24, 289上, 这两个内含子的侧翼基因序列是完全相同的。cDNA的 5'末端 (AGT) 可能也是 Spatzle的转录起始位点, 因为 AGT被包含在 GCA GT之内, GCA GT是一段与节肢动物基因中共有的具有代表性的定位在起始位点前后 10个碱基的 5'核苷酸 (TCAGT) 极其相似的一段序列, 而在 3'端没有 TATA BOX。外显子 1包括一个大于 175bp的 5非编码区和一个 39bp的编码信号肽 1-13残基的序列。外显子 2 (235bp) 编码了后 5个信号肽残基和前体区的前半段。外显子 3 (166bp) 和部分外显子 4 (218bp) 编码了其余的前体区并以 Ile - Ala - Gln - Arg结束。具有活性的配体, 起始于 Ile - Ala - Gln - Arg, 是由 3'端的外显子 4和全部的外显子 5, 以及 5'端的外显子 6编码的^[10]。

序列比对显示家蚕的 Spatzle与果蝇的 Spatzle的氨基酸序列具有 54%的相似性。这两种序列和埃及伊蚊及冈比亚按蚊的 SPZ在系统进化树上构成一支。Spatzle蛋白通常是以不具有活性的前体形式被生物合成并分泌出来, Spatzle被以一个 80KD的天然蛋白分子分泌到细胞外。微序列测定这种分泌蛋白的氨基端发现该蛋白的初级翻译产物起始于 Lys26 而不是 Thr22。未经加工的 Spatzle蛋白包括 N端信号肽区域, 前体区和 C末端由 106个氨基酸残基组成的 C106区域。蛋白分子质量检测结果发现比最初通过氨基酸预测的要高, 凝集素结合实验证明分子质

量的增加是由于糖基化作用引起的。推测糖基化在 Spatzle 蛋白形成最终的结构及具有活性方面起到重要的作用。在背腹轴发生及天然免疫的过程中,特异性的刺激能够激发丝氨酸蛋白酶的级联反应,该反应末端的成员能够使该蛋白在 C 端的 106 氨基酸残基处水解,前体形式的 Spatzle 是不具有信号传导活性的,一个以二聚体形式存在的 Spatzle 前体经过内切蛋白酶的水解之后形成一个 C-106 的形式,该片断能与 Toll 受体的膜外区域相结合,并建立信号。在背腹轴发育模式中一个特异性的胰岛素的内切蛋白酶 Easter 来水解 Spatzle,另外一个相似的蛋白酶 SPE 在天然免疫途径中用来水解 Spatzle^[11]。

通过运用折叠识别和比较建模方法,利用先前已知的 6 个黑腹果蝇和 1 个冈比亚按蚊的 Spatzle 成熟肽 C106 的氨基酸序列排列为基础,建立出了 Spatzle 蛋白的立体结构模型。其中包括 6 个保守的半胱氨酸残基形成的 3 对分子内的二硫键构成的一具典型的胱氨酸结的结构基序。第 7 个半胱氨酸残基形成了一对分子间的二硫键,用于连接两个 Spatzle 蛋白单体。Spatzle 蛋白决定其功能的重要位点由 10 个氨基酸残基组成,其中 9 个定位于二级结构元件 α -链的连接区,形成一个典型的蛋白质结合表面。该表面中心包含了一个芳香族残基和 3 个疏水性残基,周围是 5 个亲水性或电荷残基。这一结构可能有得于两个单体 Spatzle 蛋白的主功能区一起通过电荷作用参与 Toll 受体的结合^[12]。

参考文献

- [1] Marc S. Halfon, Haig Keshishian. The Toll Pathway Is Required in the Epidermis for Muscle Development in the *Drosophila* Embryo [J]. *Developmental Biology*, 1998, 199: 164 - 174.
- [2] Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira. Toll receptors and pathogen resistance [J]. *Cellular Microbiology*, 2003, 5(3): 143 - 153.

- [3] James S. Parker, Kenji Mizoguchi, Nicholas J. Gay. A Family of Proteins Related to Spatzle, the Toll Receptor Ligand, are encoded in the *Drosophila* Genome [J]. *Structure Function and Genetics*, 2001, 45: 71 - 80.
- [4] 朱学农,谭玉文,张玉梅,等. Toll 样受体在先天性免疫反应中的作用 [J]. *免疫学杂志*, 2006, 22(3): 37 - 41.
- [5] 任美玉,吴欣怡. Toll 样受体的研究进展,现代免疫学 [J]. 2006, 24(4): 340 - 341.
- [6] Xiaodi Hu, Yoshimasa Yagi, Takahiro Tanji, et al. β Multimerization and interaction of Toll and Spatzle in *Drosophila* [J]. *PLoS*, 2004, 101(25): 9369 - 9374.
- [7] Takahiro Tanji, Xiaodi Hu, Alexander N. R. Weber. Tony β Toll and MD Pathways Synergistically Activate an Innate Immune Response in *Drosophila melanogaster* [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2007, 27(12): 4578 - 4588.
- [8] 张宗梁,姚鑫. Toll 受体介导的天然免疫信号传递系统:从果蝇到人类 [J]. *上海免疫学杂志*, 1998, 18(6): 321 - 322.
- [9] Y. DeLotto, C. Smith, R. DeLotto. Multiple isoforms of the *Drosophila* Spatzle protein are encoded by alternatively spliced maternal mRNAs in the precellular blastoderm embryo [J]. *Mol Gen Genet*, 2001, 264: 643 - 652.
- [10] Yang Wang, Tingcai Cheng, Subrahmanyam Rayaprolu, et al. Proteolytic activation of β -spatzle is required for the induced transcription of antimicrobial peptide genes in lepidopteran insects [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2007, 31: 1002 - 1012.
- [11] Alexander N. R. Weber, Monique Gangloff, Martin C. Moncrieff, et al. Role of the Spatzle β -domain in the Generation of an Active Toll Receptor Ligand [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(18): 13522 - 13531.
- [12] 朱顺义,应壮英. 进化基因组学在昆虫天然免疫研究中的应用前景 [J]. *昆虫知识*, 2007, 44(1): 14 - 16. (责编:胡贤江)

(上接 21 页)南疆铁路沿线地区社会经济的全面发展,该地区必须通过搞好城镇基础设施建设,完善公共设施和城镇环境来吸引外来投资和人才。把该地区的资源优势转化为经济优势,充分发挥该地区的资源优势。

(3)解放思想,深化改革,提高政策和措施的前瞻性和科学性,加强法制建设和科学管理。努力争取自治区和国家的财政支持和开发建设资金,利用在国家实施西部大开发的机遇和优惠政策已确定的情况下,争取国家和自治区政府足够的资金投入,这是加快该地区社会经济发展和城市化进程的保障。

(4)要积极推进教育事业的发展,以提高民族文化素质为前提,把该地区传统的经济模式和思想意识,转移到依靠教育和提高劳动者素质来发展社会经济的轨道上来。因此发展教育是推动社会和经济发展的必要条件,发展教育,提高人口素质,培养人才和高素质的劳动者,是该地区

摆脱贫困,实现社会经济、城市化和生态环境全面协调发展的重要保障。

参考文献

- [1] 陈彩苹,楚新正,张素红. 北疆铁路沿线城市经济功能和产业发展方向研究 [J]. *干旱区资源与环境*, 2006, 9(20): 10 - 14.
- [2] 任宗哲. 城市功能和城市产业结构关系探析 [J]. *西北大学学报*, 2000, 11(12): 32 - 34.
- [3] 关春玉,吴建林. 强化城市功能的若干问题探讨 [J]. *西北民族大学学报(哲学社会科学版)*, 2004(2): 91 - 94.
- [4] 林良乐. 我国县级以上城市规模等级分布的省际差异性分析 [J]. *厦门大学经济学院计划统计系*. 福建厦门. 361005.
- [5] 杨苏民,陈毕业. 中国新疆南疆铁路西延后加快南疆经济发展的对策研究 [J]. *中国软科学*, 1999(7): 85 - 88.
- [6] 国家统计局新疆调查总队. 新疆统计年鉴 2007. 中国统计出版社(电子版).

(责编:陶学军)