

• 2004 年诺贝尔奖介绍 •

蛋白质的选择性降解机制

——2004 年诺贝尔化学奖部分工作介绍

郝春明 赫荣乔*

(中国科学院生物物理研究所脑与认知科学研究中心, 视觉信息加工重点实验室, 北京 100101)

摘要 如何识别和选择性降解蛋白质是细胞生命过程中的重要环节. 泛素-蛋白酶体需能降解途径的发现, 揭示了蛋白质在细胞内选择性降解的普遍方式. 对于需要清除的蛋白质, 通过其赖氨酸残基侧链 ϵ -氨基连接多聚泛素链 (降解标签), 继而在蛋白酶体中被降解. 这种选择性降解机制对于维持蛋白质在细胞内含量的动态平衡起到了关键性作用.

关键词 泛素, 蛋白酶体, 蛋白质降解

学科分类号 Q51

蛋白质是生命活动的基本功能分子. 在细胞内, 蛋白质处于合成 (诞生) 与降解 (死亡) 的动态平衡. 迄今, 至少有 5 次诺贝尔奖授予研究蛋白质如何 “诞生” 的科学家, 而 2004 年的诺贝尔化学奖表彰了蛋白质 “死亡” 方面的研究成果. 以色列籍的 Ciechanover、Hershko 和美国籍的 Rose 在该领域内的杰出工作, 揭示了泛素介导的蛋白质酶解机理. 细胞给需要清除的蛋白质挂上 “死亡标签” (多聚泛素链), 在一系列酶作用下, 该蛋白质被降解. 泛素介导的蛋白酶体系统与蛋白质质量控制、细胞周期、DNA 修复、转录以及免疫应答等密切相关, 也与许多疾病的发生相关.

大多数蛋白酶 (包括溶酶体酶体系) 降解底物时不需要 ATP 提供能量, 如胃蛋白酶、胰蛋白酶等. 20 世纪 40 年代, Schoenheimer^[1] 通过同位素示踪技术观察到动物细胞内, 蛋白质代谢处于合成与降解的动态平衡. 后来, Simpson^[2] 在肝脏组织培养的切片中检测到了氨基酸的产生, 并揭示出细胞内大部分蛋白质的降解需要能量. 20 世纪 70 年代初, Hershko 和 Tomkins^[3] 通过肝肿瘤细胞培养, 研究酪氨酸转氨酶的需能降解, 推测酶解的早期阶段需要 ATP. 其后, Etlinger 和 Goldberg^[4] 建立了由 ATP 提供能量并降解蛋白质的无细胞体系 (兔网状细胞溶解物系统). Ciechanover、Hershko 和 Rose 等采用该无细胞体系, 进行了一系列开创性研究工作, 发现和阐明了泛素-蛋白酶体这一选择性需能降解的途径.

1 泛素-蛋白酶体降解途径的发现

1978 年, Ciechanover 等^[5] 在通过 DEAE-纤维素柱除去网状细胞溶解物的血色素时意外观察到: 溶解物被分成两部分而失去蛋白酶解活性, 重新混和两部分, 其活性恢复. 第一部分的活性组分是一种热稳定蛋白 (分子质量约 9 ku). 后来, 该蛋白质被 Wilkinson、Urban 和 Hass 等证明是泛素. 网状细胞溶解物的第二部分通过盐析可再分成两部分, 即 ATP 稳定性蛋白 (约 450 ku) 以及含有 E1、E2、E3 酶的混合物^[6].

1980 年, Ciechanover 等^[7] 通过¹²⁵I 标记, 证实泛素可与一些蛋白质形成共价连接. 同年, Hershko 等^[8] 发现多个泛素分子以链状方式, 通过 C 端羧基与底物赖氨酸 ϵ -氨基形成酰胺键. ATP 的参与提供了反应过程的可控性和底物特异性, 这一现象提示泛素介导的蛋白质需能酶解可能具有生物学普遍意义^[9]. 1981 年, 泛素活化酶 (E1) 被分离纯化, 该酶与泛素之间形成高能硫酯键^[10,11]. 同时, 在纯化泛素活化酶 E1 的过程中发展了共价亲和和层析柱方法^[12,13], 此方法对于 E2、E3 酶的纯化至关重要.

2 泛素-蛋白酶体系统的组成成员

泛素 (76 个氨基酸, 8.5 ku) 广泛存在于真核

* 通讯联系人.

Tel: 010-64889876, E-mail: herq@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2004-10-26, 接受日期: 2004-10-31

细胞内, 进化上高度保守, 人类与酵母间仅有 3 个氨基酸残基的差异. 泛素链与蛋白质底物的结合, 形成被蛋白酶体降解的识别信号. 另外, Finley 等^[14]发现了泛素与蛋白酶解无关的功能. 他们从酵母中筛选出了 3 种与核糖体蛋白连接的泛素基因, 所编码的泛素与之短暂的相互作用为核糖体高效生成所必需. 泛素化在蛋白质的内吞和外泌作用中有目标定位的功能^[15]. 近年来, 一些泛素样蛋白质被相继发现, Pakin 蛋白便是其中之一, 由于其 C 端不含甘氨酸残基, 故不能形成类似泛素的链状结构而难以降解, 该蛋白质被认为与帕金森病有关^[16].

泛素活化酶 E1: 通过半胱氨酸残基与泛素 C 端活化的甘氨酸残基形成硫酯键^[17], E1-泛素中间体中的泛素可以转移给数个 E2s.

泛素转移酶 E2s: 以 UBCs (ubiquitin-conjugating E2 enzymes) 方式起作用, 活性部位为半胱氨酸, 部分 E2 成员在细胞特定过程中发挥作用, 但 E2 的全部作用尚不清楚.

泛素连接酶 E3s: 为泛素-蛋白酶体系统选择性降解机制的关键因素, 识别被降解的蛋白质并将泛素连接到底物上. 目前对 E3s 作用方式了解相对较少. 不同 E3s 的氨基酸序列差异较大, 并且与多种不明功能的亚单位组成复合物, 其功能需进一步研究.

蛋白酶体: 由 2 个 19S 和 1 个 20S 亚单位组成的桶状结构, 19S 为调节亚单位, 位于桶状结构的两端, 识别多聚泛素化蛋白并使其去折叠. 19S 亚单位上还具有一种去泛素化的同工肽酶, 使底物去泛素化. 20S 为催化亚单位, 位于两个 19S 亚单位的中间, 其活性部位处于桶状结构的内表面, 可避免细胞环境的影响. 酵母 20S 亚单位由 4 个环状结构 ($\alpha\beta\beta\alpha$) 组成, α 环和 β 环又分别由 7 个亚基组成. 20S 核心颗粒复合物的结构可表示为: $\alpha_{1\sim7}\beta_{1\sim7}\beta_{1\sim7}\alpha_{1\sim7}$ ^[18].

3 泛素-蛋白酶体的需能降解途径

泛素-蛋白酶体降解途径包括两个主要阶段: 泛素与蛋白质底物的相互作用; 蛋白酶体对底物的降解^[17].

第一阶段 (如图 1 所示): a. 高能硫酯键 E1-泛素复合物的形成, 消耗一分子 ATP, 并释放一分子 AMP 和一分子焦磷酸; b. 活化泛素 (E1-泛素复合物) 转移到 E2s 上, 释放出 E1, 形成高能键 E2-泛素复合物; c. 底物 (被磷酸化、氧化、错误

折叠或与辅助蛋白结合的蛋白质) 被 E3s 识别并与之结合; d. E2-泛素复合物上的泛素转移到 E3s 上, 形成高能键复合物, 继而底物通过赖氨酸的

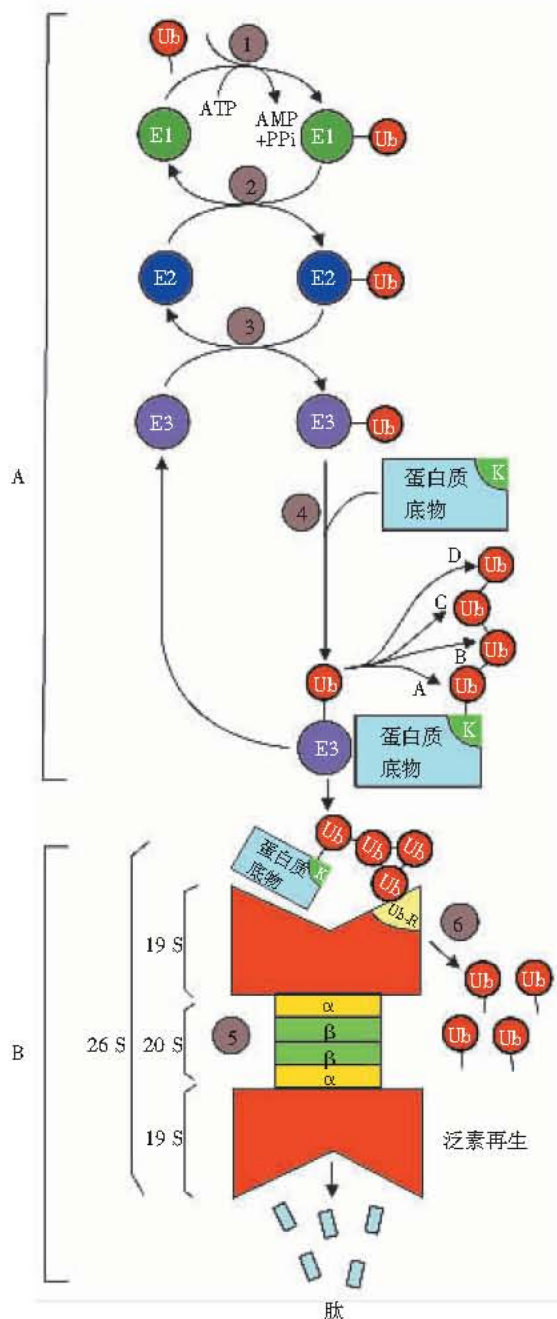


Fig. 1 The ubiquitin - proteasome pathway^[17]

图 1 泛素-蛋白酶体途径^[17]

(A) 泛素连接到底物分子上; (B) 经泛素标记的底物被 26S 蛋白酶体降解. (1) E1 将泛素活化; (2) 活化泛素从 E1 转移到 E2 家族成员上; (3) 活化泛素从 E2 转移到特异识别底物的 E3 上; (4) 形成底物-E3 复合物并生成底物连接的泛素链; (5) 多聚泛素化底物与 26S 蛋白酶体的泛素受体亚单位 (19S 复合物) 结合并由 20S 复合物将其降解为片段; (6) 同工肽酶使泛素再生.

e-氨基形成酰胺键与泛素连接, 泛素分子逐个相加形成链状结构. 此外, 第一个泛素分子也可与底物 N 端氨基酸残基连接^[19].

第二阶段: e. 底物泛素链与蛋白酶体 19 S 的泛素受体相互作用, 蛋白质底物去折叠, 并通过蛋白酶体受体端裂隙进入 20 S 核心颗粒内部, 被逐步降解; f. 在泛素 C 端水解酶、脱泛素酶和寡肽酶的作用下, 释放出泛素分子 (可再次参与循环).

4 泛素-蛋白酶体系统的生物学意义

为了证实泛素-蛋白酶体系统在细胞生命过程中的重要作用, Yamada 等^[20] (1980 年) 建立了泛素-蛋白酶体缺陷型细胞系, 通过诱变鼠细胞并筛选出温度敏感型 ts85 细胞系, 在敏感温度下该细胞株出现染色体异常浓缩和组蛋白磷酸化不足, 细胞周期被固定在 G2 期 (DNA 复制完成, 尚未进入有丝分裂期). 这表明此缺陷可能导致染色质结构的异常改变. 值得注意的是, Marunouchi^[21] 所在的日本研究团队观察到泛素化组蛋白 H2A, 该蛋白质的泛素化为温度依赖. 在适宜温度下细胞内的 H2A 被泛素化, 在敏感温度下被抑制. 组蛋白 H2A 的泛素化需要 ATP, 在敏感温度下泛素化速度减慢而降解速度加快^[22]. 在野生型或 ts85 回突变细胞中均未观察到这种现象. 基于 H2A 在 ts85 突变细胞中的泛素化现象, Varshavsky 等^[23] 证实了 ts85 细胞中温度敏感性组分是 E1.

上述 ts85 细胞系的研究工作奠定了泛素参与细胞周期调控的基础. 同时, 细胞周期调控因子 Cdc34 被证实是泛素转运酶 E2 中成员之一, 在进化上高度保守^[24]. Kirschner 等^[25,26] 进一步证明了细胞退出有丝分裂的关键是细胞周期蛋白经泛素-蛋白酶体途径降解所致. 后来, Nasmyth 等^[26] 证实, 在有丝分裂和减数分裂过程中, E3 对染色体的分离起着关键作用. 有丝分裂和减数分裂过程中染色体的错误分离则可导致染色体数目改变, 也是导致人类自发性流产的最主要原因. 泛素-蛋白酶体系统的阐释, 对于染色体数目异常的遗传性疾病, 如 Down 氏综合征 (21 染色体三体细胞), 以及恶性实体瘤发病机制的研究提供了理论和方法学基础.

肿瘤抑制因子 P53 蛋白被称为“基因组卫士”, 50% 以上的人类癌症中均发现该蛋白质的突变. P53 经泛素-蛋白酶体途径降解, 其中 E3 与 P53 形成复合体^[27]. DNA 损伤后, P53 出现磷酸化, 降低与 E3 的结合, 减少 P53 的降解, 维持

P53 在细胞内的含量. 人类乳头瘤病毒的感染与子宫颈癌的发生密切相关. 此病毒通过利用自身编码的蛋白激活寄主细胞的 E3 酶, 使 P53 蛋白泛素化被降解, 而避开 P53 的抑制作用, 使感染细胞不能正常进行 DNA 修复, 突变的积累最终导致癌变的发生^[28].

神经退行性疾病, 如老年痴呆、帕金森氏症、肌萎缩性侧索硬化等, 存在老年斑、内函体、纤维样沉积等现象, 尽管在形态学上看不出泛素所起的作用, 但泛素-蛋白酶体降解系统可能出现某种缺陷, 使得错误折叠的蛋白质不能被降解, 而在体内积累并产生细胞毒性.

转录因子 NF- κ B 在免疫和炎症反应中起重要作用. 正常情况下, NF- κ B 与细胞质中的抑制蛋白 I κ B 形成非活性复合体. 当细胞受到细菌感染或有自身物质信号时, I κ B 被磷酸化, 进入泛素介导的蛋白质酶解系统被降解, NF- κ B 则转移至细胞核内, 启动相关基因的表达^[29].

泛素-蛋白酶体系统也产生一些肽段, 这些片段可被 MHC- I 类分子呈递给 T 淋巴细胞, 从而在防御病毒感染中起作用.

遗传性囊性纤维化 (cystic fibrosis, CF) 与一种囊性纤维跨膜电导调节因子 (细胞质膜氯离子通道调节因子, CFTR) 的功能性缺失有关. 绝大多数 CF 病例由单基因位点突变所致, 表现为苯丙氨酸 (Δ F508) 缺失, 造成 CFTR 蛋白的错误折叠, 被泛素介导的蛋白质酶解系统识别、降解, 造成该因子功能性缺失.

泛素系统已成为研制相关药物的靶点, 从而防止特定蛋白的降解, 或通过激发此系统以降解不需要的蛋白质. 一种蛋白酶体抑制因子 Valcade (PS341), 作为新药用于治疗多发性骨髓瘤已经进入临床试验阶段.

5 展 望

泛素-蛋白酶体降解系统的发现为深入理解细胞诸多生理过程奠定了基础. 可以预见, 将会发现更多的蛋白质和细胞生理过程与此途径相关, 也会有一些疾病的病理机制得以阐明, 以此系统为靶点的新药也将逐渐增多. 泛素-蛋白酶体系统的研究领域将具有更大的发展潜力.

参 考 文 献

- 1 Olson R E. The dynamic state of body constituents (Schoenheimer,

- 1939). *J Nutr*, 1997, **127** (5 Suppl): 1041S ~ 1043S
- 2 Simpson M V. The release of labeled amino acids from the proteins of rat liver slices. *J Biol Chem*, 1953, **201** (1): 143 ~ 154
- 3 Hershko A, Tomkins G M. Studies on the degradation of tyrosine aminotransferase in hepatoma cells in culture. Influence of the composition of the medium and adenosine triphosphate dependence. *J Biol Chem*, 1971, **246** (3): 710 ~ 714
- 4 Etlinger J D, Goldberg A L. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, **74** (1): 54 ~ 58
- 5 Ciechanover A, Hod Y, Hershko A. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1978, **81** (4): 1100 ~ 1105
- 6 Hershko A, Ciechanover A, Rose I A. Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76** (7): 3107 ~ 3110
- 7 Ciechanover A, Heller H, Elias S, *et al.* ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77** (3): 1365 ~ 1368
- 8 Hershko A, Ciechanover A, Heller H, *et al.* Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77** (4): 1783 ~ 1786
- 9 Wilkinson K D, Urban M K, Haas A L. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem*, 1980, **255** (16): 7529 ~ 7532
- 10 Ciechanover A, Heller H, Katz-Etzion R, *et al.* Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78** (2): 761 ~ 765
- 11 Hershko A, Ciechanover A, Rose I A. Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown. *J Biol Chem*, 1981, **256** (4): 1525 ~ 1528
- 12 Haas A L, Rose I A. Hemin inhibits ATP-dependent ubiquitin-dependent proteolysis: role of hemin in regulating ubiquitin conjugate degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78** (11): 6845 ~ 6848
- 13 Ciechanover A, Elias S, Heller H. "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem*, 1982, **257** (5): 2537 ~ 2542
- 14 Finley D, Bartel B, Varshavsky A. The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature*, 1989, **338** (6214): 394 ~ 401
- 15 Hicke L, Riezman H. Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell*, 1996, **84** (2): 277 ~ 287
- 16 Kitada T, Asakawa S, Hattori N, *et al.* Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 1998, **392** (6676): 605 ~ 608
- 17 Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J*, 1998, **17** (24): 7151 ~ 7160
- 18 Groll M, Ditzel L, Lowe J, *et al.* Structure of 20 S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, 1997, **386** (6624): 463 ~ 471
- 19 Breitschopf K, Bengal E, Ziv T, *et al.* A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *EMBO J*, 1998, **17** (20): 5964 ~ 5973
- 20 Matsumoto Y, Yasuda H, Mita S, *et al.* Evidence for the involvement of H1 histone phosphorylation in chromosome condensation. *Nature*, 1980, **284** (5752): 181 ~ 183
- 21 Marunouchi T, Yasuda H, Matsumoto Y, *et al.* Disappearance of a basic chromosomal protein from cells of a mouse temperature-sensitive mutant defective in histone phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1980, **95** (1): 126 ~ 131
- 22 Matsumoto Y, Yasuda H, Marunouchi T, *et al.* Decrease in uH2A (protein A24) of a mouse temperature-sensitive mutant. *FEBS Lett*, 1983, **151** (1): 139 ~ 142
- 23 Finley D, Ciechanover A, Varshavsky A. Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell*, 1984, **37** (1): 43 ~ 55
- 24 Goebel M G, Yochem J, Jentsch S, *et al.* The yeast cell cycle gene CDC34 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Science*, 1988, **241** (4871): 1331 ~ 1335
- 25 Glotzer M, Murray A W, Kirschner M W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, 1991, **349** (6305): 132 ~ 138
- 26 Nasmyth K. Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet*, 2001, **35**: 673 ~ 745
- 27 Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*, 1997, **420** (1): 25 ~ 27
- 28 Scheffner M, Huibregtse J M, Vierstra R D, *et al.* The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, 1993, **75** (3): 495 ~ 505
- 29 Chen Z, Hagler J, Palombella V J, *et al.* Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev*, 1995, **9** (13): 1586 ~ 1597

Specificity of Protein Degradation in The Ubiquitin-proteasome Pathway

HAO Chun-Ming, HE Rong-Qiao *

(Laboratory of Visual Information Processing, Center for Brain and Cognitive Sciences,
Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Proteolysis of cellular proteins is carried out by a complex cascade of enzymes and displays a high degree of specificity towards its numerous substrates. Discovery and studies of the ubiquitin-proteasome pathway reveal that the specific protein degradation is a highly complex, temporally controlled and tightly regulated process which plays important roles in a broad array of basic cellular processes. A defective protein, which binds poly-ubiquitin chain (so-called "degrading label") through its ϵ -amino group of Lys residue, is degraded in the proteasome. This selectively cellular elimination of defective protein is a key process in protein kinesin.

Key words ubiquitin, proteasome, protein degradation

* Corresponding author. Tel: 86-10-64889876, E-mail: herq@sun5.ibp.ac.cn

Received: October 26, 2004 Accepted: October 31, 2004