



多种代谢物调控蛋白质翻译后修饰的新机制研究和药物筛选策略

杨思园¹, 朱泽文², 陈滢旭³, 杨丰瑞⁴, 吴鑫源^{5,6}, 王江⁵, 李文洋⁷, 杨巍维^{3*}, 宋晓玉^{4*}, 陆晓杰^{5,6*}, 柳红^{5*}, 蒋维^{2*}, 雷晓光^{7*}, 赵世民^{1*}

1. 上海市代谢重塑与健康重点实验室, 代谢与整合生物学研究院, 上海 200032

2. 复旦大学上海医学院基础医学院生物化学与分子生物学系代谢分子医学教育部重点实验室, 上海 200032

3. 浙江省系统健康科学重点实验室, 国科大杭州高等研究院生命与健康科学学院, 杭州 310024

4. 中国科学技术大学合肥微尺度物质科学国家研究中心, 合肥 230026

5. 原创新药研究全国重点实验室; 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203

6. 中国科学院大学, 北京 100049

7. 北京分子科学国家研究中心, 生物有机与分子工程教育部重点实验室, 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871

*通讯作者, E-mail: weiweiyang@sibcb.ac.cn; sonxiaoyu@ustc.edu.cn; xjlu@simm.ac.cn; hliu@simm.ac.cn; jiangw@fudan.edu.cn; xglei@pku.edu.cn; zhaosm@fudan.edu.cn

收稿日期: 2024-09-24; 接受日期: 2024-12-09; 网络版发表日期: 2025-01-23

国家自然科学基金(编号: 91753207, 92053203, 92253305, 91953108, 92253305)资助项目

摘要 代谢物是生物大分子修饰最主要的供体来源, 环境或细胞内应激导致的代谢物改变信号也被整合到生命信号网络中. 蛋白质磷酸化、乙酰化和甲基化等经典翻译后修饰(post-translational modification, PTM)以ATP、乙酰辅酶A和S-腺苷甲硫氨酸(SAM)等能量或物质表征代谢物为底物, 传递共性代谢物信号; 我们的研究发现, 代谢物可以通过不同机制调控其作为供体外的其他PTM: 巴豆酰辅酶A能作为酰基供体促进细胞周期依赖的EB1蛋白的巴豆酰化修饰, 通过调控微管骨架的动态性维系基因组的稳定性; α -KIV和 α -KG能够分别调控蛋白质磷酸化修饰和羟基化修饰, 介导与自身代谢无关的TCR信号通路和Hedgehog信号通路; 此外, 天然植物的次生代谢物也能够促进AD相关蛋白的泛素化降解. 这些发现为代谢物调控细胞生理病理的研究打开了新的角度和视野. 基于代谢物调控翻译后修饰的新机制, 我们以病理过程中的关键蛋白为例, 高通量筛选了瞬时受体电位香草酸通道3蛋白(TRPV3)和菌源二肽基肽酶4 (DPP4)的小分子抑制剂, 为创新药的研发和疾病的干预提供了新的思路.

关键词 生物大分子, 翻译后修饰, 代谢物调控, 细胞信号, 干预

1 引言

代谢物是生命活动的能量与合成原料的来源, 可

以通过非共价和共价两种方式作用于生物大分子, 将其信号整合到生命信号网络^[1~3]. 生物大分子修饰的发生、稳态维持机制及其生理病理重要性研究已经成为

引用格式: Yang S, Zhu Z, Chen Y, Yang F, Wu X, Wang J, Li W, Yang W, Song X, Lu X, Liu H, Jiang W, Lei X, Zhao S. Novel mechanisms of protein post-translational modifications regulated by multiple metabolites and strategies for drug screening. *Sci Sin Chim*, 2025, 55: 986–996, doi: [10.1360/SSC-2024-0223](https://doi.org/10.1360/SSC-2024-0223)

国际生命科学的竞争前沿. 用化学生物学方法对生物大分子修饰进行干预成为创新药物的重要开发策略.

代谢物通过不同的方式修饰生物大分子. 蛋白质翻译后修饰(post-translational modification, PTM)是调控蛋白质功能的主要途径之一. 乙酰辅酶A (Acetyl-CoA, Ac-CoA)、同型半胱氨酸硫内酯(homocysteine thiolactone, HTL)和多聚不饱和脂肪酸(PUFA)等活性代谢物可以自发修饰蛋白质, 且尚未发现特定的去修饰酶^[4-6], 而氨基酸、乳酸和巴豆酰辅酶A等代谢物借助特定修饰酶修饰蛋白质, 且相关修饰可以被具有去乙酰化酶活性的酰胺水解酶去除^[3,7,8].

PTM有重要的生理病理意义, 如巴豆酰化修饰参与调控细胞微管骨架的动态性. 微管相关蛋白EB1是进化上保守的核心的微管动态性调控因子, 能够特异性地定位到正在生长的微管正端, 其水平与肝癌等多种肿瘤的不良预后密切相关^[9]. 细胞代谢中间产物乙酰辅酶A和巴豆酰辅酶A均能作为酰基供体驱动细胞周期依赖的EB1蛋白的乙酰化修饰和巴豆酰化修饰^[10-12], 通过微管骨架的动态性维系基因组的稳定性. EB1蛋白在有丝分裂期K66位点的巴豆酰化动态修饰^[10], 借助遗传密码拓展策略, 我们通过细胞内引入非天然氨基酸嵌入技术表达巴豆酰化蛋白以及在近生理水平的类器官中干预催化酶的活性, 确认了持续巴豆酰化修饰引发纺锤体定向缺陷^[10,13].

在肿瘤等病理过程中, 代谢重编程是PTM的重要调控因素. 代谢物改变可以导致生物大分子表观遗传修饰和PTM变化, 从而将细胞代谢与信号转导联系起来^[13]. 三羧酸循环中重要的活性代谢中间产物 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, α -KG)参与多种生物大分子修饰的去甲基化过程. 用 α -KG作为底物的双加氧酶家族包括组蛋白去甲基化酶(jumonji C-domain lysine demethylases, JmjC-KDMs)、DNA去甲基化酶(ten-eleven translocation DNA cytosine-oxidizing enzymes, TETs)和脯氨酸羟化酶(prolyl hydroxylases, PHDs). 代谢物调控与自身代谢无关的PTM是生物大分子修饰研究最为活跃的领域, 其涉及的生物医药领域包括肿瘤发生发展和免疫细胞的发育、分化与功能调控等.

除了细胞自身代谢物改变调控PTM, 植物或其他来源的次生代谢物也可以调控PTM. 近年来, 研究表明天然产物不仅能够直接与生物大分子特异性结合,

参与生物大分子的修饰过程, 还通过调控相关酶的活性, 间接影响生物大分子的修饰. 针对天然产物进行结构修饰和进一步改善其成药性, 发现结构新颖的原创新药, 采用化学生物学和多维组学相结合的研究策略, 揭示其作用靶标和生物大分子的调控修饰新机制. 天然产物在调控生物大分子修饰方面展现出广泛的应用前景, 深入研究天然产物的作用机制不仅有助于揭示生物大分子修饰的调控机制, 还能为原创新药研发提供重要的理论依据和实践指导^[14].

在药物研发和筛选过程中, PTM也是不可忽视的重要因素. 除了代谢物的结构类似物可以作为抑制剂或激活剂的候选分子外, 与PTM相关的修饰酶和去修饰酶以及参与调控PTM的所有其他蛋白都是潜在的干预靶标. 化学遗传学是一门使用化学小分子研究生物系统机制与功能的交叉学科. 在本研究中, 我们采用化学遗传学的策略, 针对药物靶标设计高通量筛选体系, 通过筛选小分子化合物库开发高选择性、高特异性的的小分子抑制剂, 通过生理学、结构生物学等手段阐明作用机制, 并在相关疾病模型(如皮炎引发的瘙痒^[15]、2型糖尿病^[16])中验证了小分子抑制剂的治疗效果, 不仅为进一步阐明相关生物学机制提供了小分子化学工具, 而且为开发相关疾病的新疗法提供了有效的策略. 代谢物参与生物大分子修饰调控并影响细胞功能的机制研究为揭示肿瘤、心血管疾病、神经系统疾病等多种疾病领域的药物新靶标及干预策略提供了新方向. 目前已有Ivosidenib、Decitabine等多款干预生物大分子修饰的药物上市^[17].

DNA编码化合物库(DNA-encoded chemical library, DEL)技术是近年来发展的药物筛选的新兴技术. DEL技术结合了组合化学的高效合成能力、分子生物学的精准性以及化学生物信息学的分析能力等诸多优势, 与传统高通量筛选相比提高了筛选效率, 减少了筛选时间和成本, 显著缩短了药物发现周期^[18]. 随着on-DNA化学反应的不断开发以及多种DEL筛选方法的出现, DEL技术已广泛应用于药物开发, 并已推动多个候选药物进入临床研究阶段^[19-21]. 本研究中, 我们基于DEL技术, 针对代谢物参与的生物大分子修饰调控机制的关键靶标(代谢物、代谢酶、代谢转运体等), 高通量筛选了相关蛋白的小分子抑制剂, 为疾病的致病机理研究提供了新思路, 也为基于代谢调控的新药研发提供候选分子提供了更多可能性.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

DMOG ($\geq 98\%$, Sigma, 美国); SAG ($\geq 98\%$, Sigma, 美国), Headpiece、DNA tags购自美国LGC Biosearch Technologies; DNA编码化合物构建砌块购自乌克兰Enamine和上海皓鸿生物医药科技有限公司; 化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司; HisPurTM Ni-NTA磁珠购自美国Thermo Fisher Scientific.

液相-飞行时间质谱(安捷伦科技(中国)有限公司); 二氧化碳培养箱(Thermo)、超净工作台(苏州苏洁)、Spectra Max M2e多功能酶标仪(美谷分子仪器(上海)有限公司)、台式冷冻离心机(Eppendorf)、垂直电泳槽(天能)、半干转膜仪、Chemi DocTMXRS+凝胶成像仪(Bio-Rad); CO₂培养箱(Thermo); 真空吸液器(mini desktop vacuum pump GL-802b, 其林贝尔); 电动吸引器(斯曼峰)。SDS-PAGE聚丙烯酰胺凝胶电泳实验仪器: 电泳板、电泳槽(BioRad); 转膜槽(天能); 凝胶成像仪(Amersham Imager 608, GE); Typhoone (GE Amersham)。

2.2 实验方法

2.2.1 细胞制备与培养

小鼠脾脏Naïve CD8⁺ T细胞的提取和培养: 磷酸盐缓冲溶液(PBS)按照5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 稀释anti-mouse CD3 ϵ 和anti-mouse CD28抗体, 在37℃培养箱中包被培养皿4 h, 用PBS洗1遍。C57BL/6-WT小鼠颈椎脱臼处死, 取小鼠脾组织在75%酒精中清洗3 s, PBS中清洗30 s, 置于预冷的PBS中转移至生物安全柜。取小鼠脾组织和25 mL 1640培养基置于40 μm 细胞滤网研磨, 收集研磨过滤的细胞悬液, 1500 r/min 4℃离心5 min, 倾倒入上清, 加入25 mL PBS, 1500 r/min 4℃离心5 min, 倾倒入上清, 加入1 mL T细胞分离液(PBS, 2% FBS, 1 mmol/L EDTA)制备单细胞悬液, 随后按照试剂盒操作分离CD8⁺ T细胞, 具体步骤: 调整细胞浓度至 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ 个/mL, 体积为1 mL, 依次加入10 μL FcR blocker、50 μL Isolation Cocktail, 室温静置10 min。取出Rapid-Spheres-beads涡旋30 s, 加入RapidSpheres-beads 125 μL , 室温静置5 min。轻柔吹匀后静置于磁力架2.5 min, 取上清至新的离心管, 重复一遍。1500 r/min 4℃离心5 min, 弃上清。T细胞完全培养基(R/MINI

1640, 10% FBS, 20 mmol/L HEPES, 1 mmol/L丙酮酸钠, 0.05 mmol/L 2-巯基乙醇, 1 $\times$ GlutaMAX, 1 $\times$ Anti-anti)重悬细胞培养在预包被的培养皿中。Jurkat T细胞培养在完全培养基(R/MINI1640, 10% FBS, 1%双抗)中。细胞培养条件均为37℃、5% CO₂。

HepG2细胞(ATCC)培养于含10%胎牛血清(FBS)DMEM高糖培养基中, 5% CO₂, 37℃孵育; 24 h后, 换液至含2%脱脂血清(LPDS)的DMEM高糖培养基继续培养24 h; 吸弃旧培养液, 换液至新的含2% LPDS DMEM高糖培养基, 同时加入待测化合物共培养24 h。细胞在吸弃培养基后, 加入预冷的PBS缓冲液洗涤两次, 吸净残余液体, 随后加入细胞裂解液RIPA, 待裂解液与细胞充分接触后, 细胞刮刮下细胞, 并收集至1.5 mL离心管内, 冰上超声10 s, 以断裂细胞DNA; 超声处理后的样品转至离心机内, 4℃条件下, 12000 G离心10 min, 取上清溶液置于新的离心管中; 利用BCA蛋白浓度测定试剂盒或Bradford蛋白浓度测定试剂盒检测所提蛋白样品的浓度之后, 加入上样缓冲液(5 $\times$ loading buffer), 涡旋振荡混匀, 100℃条件下水浴6~10 min令蛋白变性, 冷却后取蛋白样品进行Western Blot检测。

2.2.2 Western Blot检测

收集培养的细胞, 精确细胞计数后, 分别用5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的human CD3 ϵ 抗体(OKT3克隆型)刺激0、2、5、10 min, 收集细胞, 保证每个时间点收到的细胞数目一致。采用RIPA裂解液处理细胞, 涡旋20 s后冰上放置20 min。14000 r/min 4℃离心10 min, 收集上清, 加入4 $\times$ SDS-PAGE蛋白上样缓冲液, 95℃加热10 min, 进行10% SDS-PAGE电泳(浓缩胶恒压90 V电泳20~30 min, 分离胶恒压130 V电泳约40 min)。将蛋白样品(恒流2000 mA, 150 min)转至PVDF膜, 5% BSA室温封闭1 h, 加入TBST稀释的一抗, 4℃摇床孵育过夜。加入对应的HRP标记二抗, 室温摇床孵育1 h, 加入显影液进行化学发光显影。

2.2.3 Hedgehog信号转导检测

通过Crispr-Cas9技术构建P4ha2基因敲除的NIH/3T3细胞。在六孔细胞培养板内以 1.5×10^6 个/mL的密度接种WT和P4ha2^{-/-}的NIH/3T3细胞, 次日使用0.5% FBS的培养基饥饿细胞12 h, 再加入终浓度为

200 nmol/L的SAG刺激24 h, 提取细胞总RNA并进行反转录qPCR, 检测Hedgehog下游Gli1/2、Ptch1/2等基因的表达情况. 对于DMOG抑制Hedgehog信号转导实验, 200 μ mol/L的DMOG在血清饥饿时添加; 对于影响Hedgehog信号转导的小分子抑制剂对比实验, 200 μ mol/L的EDHB、20 μ mol/L的GANT61和5 μ mol/L的7-3在SAG刺激时添加.

2.2.4 流式细胞术检测CD8⁺ T细胞活化

对于CD8⁺ T细胞早期活化能力的检测: α -KIV或等量溶剂处理anti-mouse CD3 ϵ /CD28抗体刺激中的小鼠脾脏Naïve CD8⁺ T细胞48 h, 收集细胞并用PBS洗1遍, 每组取1 $\times$ 10⁶个细胞进行后续染色操作. 具体步骤: 按照每组细胞30 μ L PBS加入LIVE/DEAD染液(1:600)配制死活细胞染液, 冰上避光染色20 min, 加入1 mL PBS, 1600 r/min 4 $^{\circ}$ C离心5 min, 弃上清. 按照每组细胞30 μ L FACS buffer (PBS, 0.1%BSA)加入anti-mouse CD8 (APC, 1:200)和anti-mouse CD69 (PB, 1:500)抗体配制染液, 冰上避光染色30 min, 加入1 mL PBS, 1600 r/min 4 $^{\circ}$ C离心5 min, 弃上清, PBS重悬. 流式细胞仪检测并收集数据, 采用FlowJo软件进行数据分析.

对于细胞因子分泌和脱颗粒能力的检测: 用 α -KIV或等量溶剂处理已活化的小鼠脾脏Naïve CD8⁺ T细胞, 并加入PMA (50 ng/mL)和Ionomycin (1 μ mol/L)和BFA (3 μ g/mL)培养4 h, 收集细胞分别进行死活染料的染色和胞外抗体染色. 具体步骤: 加入100 μ L固定/破膜液, 4 $^{\circ}$ C避光固定20 min. 加入1 mL 1 $\times$ Wash buffer, 3400 r/min 4 $^{\circ}$ C离心5 min, 弃上清. 按照每组细胞30 μ L 1 $\times$ Wash buffer加入anti-mouse IFN- γ (AF488, 1:200)和anti-mouse/human Granzyme B (AF647, 1:200)抗体配制染液, 4 $^{\circ}$ C避光染色30 min. 加入1 mL 1 $\times$ Wash buffer, 3400 r/min 4 $^{\circ}$ C离心5 min, 弃上清. 加入300 μ L PBS重悬. 流式细胞仪检测并收集数据, 采用FlowJo软件进行数据分析.

2.2.5 微管动态性检测

HeLa细胞铺于玻底共聚焦成像小皿, 24 h后利用Lipofectamine 3000转染EB1-GFP质粒或aiEB1-GFP质粒或者其突变体质粒. 转染24 h后, 将细胞转移到倒置共聚焦LSM880显微镜, 利用63 $\times$ 物镜在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂条件下进行连续成像. 对于巴豆酸钠处理的实验组, 细

胞成像前利用10 mmol/L巴豆酸钠处理30 min后进行活细胞的连续拍摄. 如图1b所示, 拍摄的时间间隔5 s, 连续成像30 s, 并对30 s内的连续图像进行叠加以展示EB1蛋白的运动轨迹. 图1d为HeLa细胞加入50 nmol/L AP20187前后分别进行活细胞的连续拍摄, 拍摄的时间间隔5 s, 并对连续的7张图片分别以“红-绿-红-绿”的模式进行叠加展示.

2.2.6 统计学分析

上述实验均独立重复3次. 采用Graphpad软件进行统计分析于绘图, 两组实验数据的统计学差异采用非配对样本 t 检验, 以 $p < 0.05$ 表示差异具有统计学意义.

3 结果与讨论

3.1 巴豆酰化调控微管

巴豆酸钠能够通过ACSS2等酶的催化促进细胞内巴豆酰辅酶A的生成和积累, 进而增强细胞内整体的巴豆酰化修饰的水平. 为了模拟肿瘤细胞中代谢中间产物巴豆酰辅酶A积累的情况, 我们通过体外添加外源的巴豆酸钠评估肿瘤细胞中潜在的EB1巴豆酰化修饰的功能. 我们的结果表明, 巴豆酸钠处理能够显著提升HeLa细胞中EB1 K66巴豆酰化修饰的水平(图1a). 为了评估巴豆酸钠对EB1蛋白的微管正端追踪活性的影响, 我们在HeLa细胞内表达EB1-GFP蛋白并利用巴豆酸钠处理, 结果发现巴豆酸钠能够显著抑制EB1蛋白的微管正端追踪活性(图1b). 为了排除潜在的K220乙酰化修饰的干扰, 我们引入了化学诱导二聚化EB1蛋白(aiEB1, AP20187 induced dimerization EB1)(图1c). 在aiEB1分子中分别引入持续巴豆酰化修饰模拟突变体(K66Q)和持续非巴豆酰化修饰模拟突变体(K66R), 在HeLa细胞内进一步测定巴豆酸钠和K66位点巴豆酰化修饰对EB1蛋白的影响. 结果发现, 巴豆酸钠提高EB1蛋白的巴豆酰化修饰水平与模拟K66持续巴豆酰化修饰类似, 均能显著抑制其微管正端追踪活性(图1d). 因此, 我们认为EB1蛋白的动态巴豆酰化修饰对其微管正端追踪活性至关重要.

3.2 代谢物调控PTM

3.2.1 α -异酮戊酸调控磷酸化参与CD8⁺ T细胞活化

CD8⁺ T细胞是适应性免疫应答的关键组成部分,

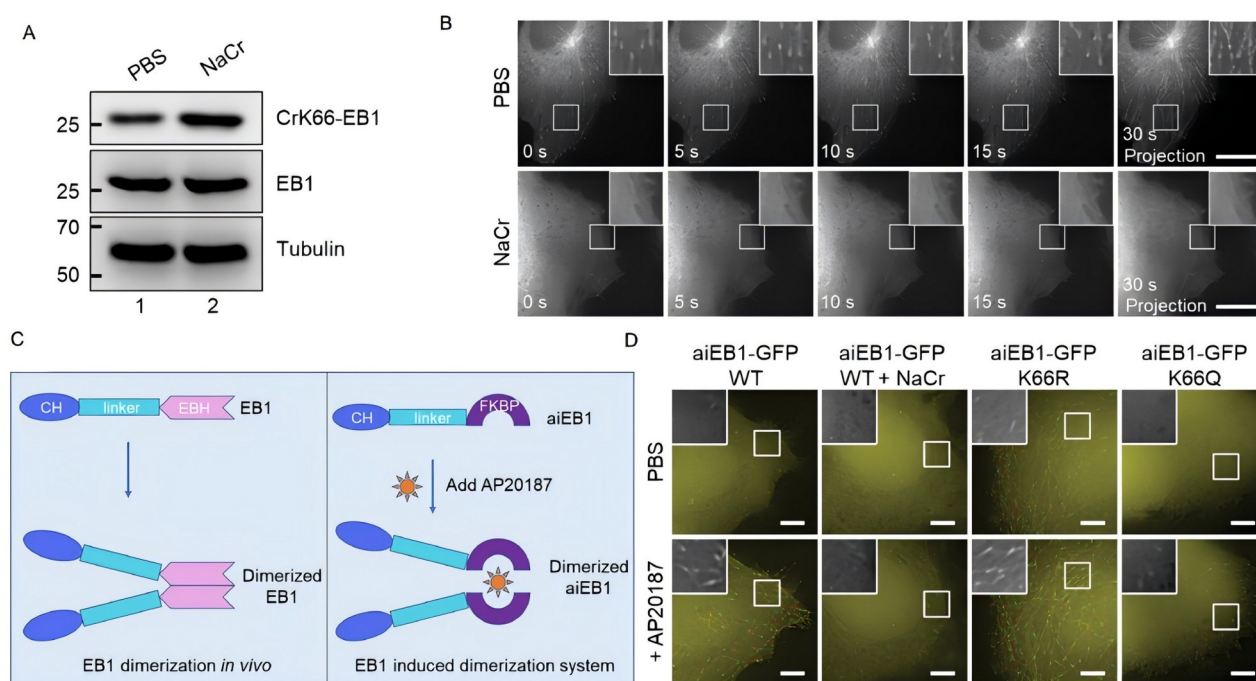


图 1 (网络版彩图) EB1巴豆酰化修饰调节其微管正端追踪活性. (A) 巴豆酸钠提升HeLa细胞EB1 K66巴豆酰化修饰水平; (B) 巴豆酸钠抑制EB1的微管正端追踪活性, 标尺: 10 μm ; (C) aiEB1诱导EB1二聚化; (D) EB1巴豆酰化修饰抑制其微管正端追踪活性, 标尺: 5 μm

Figure 1 (Color online) EB1 crotonylation regulates its microtubule plus-end tracking activity. (A) NaCr increases the level of palmitoylation of the EB1 K66 in HeLa cells; (B) NaCr inhibits microtubule plus-end tracking activity of EB1 (scale bar = 10 μm); (C) aiEB1 induced dimerization of EB1; (D) EB1 crotonylation inhibits its microtubule plus-end tracking activity (scale bar = 5 μm).

在抗肿瘤免疫中起重要作用, 其活化是调节机体免疫反应的关键过程^[22], 是一种有效的抗肿瘤免疫治疗策略^[23,24]. 但是, 目前关于代谢物如何通过翻译后修饰促进CD8⁺ T细胞的抗肿瘤功能尚未可知. 本部分研究以小鼠原代Naïve CD8⁺ T细胞作为模型, 探究代谢物 α -异酮戊酸(α -ketoisovalerate, α -KIV)对Naïve CD8⁺ T细胞活化和抗肿瘤功能的影响, 进一步研究明确 α -KIV抗肿瘤作用涉及的TCR信号转导分子机制.

为了明确 α -KIV对CD8⁺ T细胞功能的影响, 本研究采用500 $\mu\text{mol/L}$ α -KIV处理小鼠Naïve CD8⁺ T细胞48 h, 发现 α -KIV处理组CD8⁺ T细胞表面分子CD69和功能性因子IFN- γ 和Granzyme B水平显著高于对照组(均 $p < 0.05$, 图2a~c), 说明 α -KIV能够显著促进小鼠Naïve CD8⁺ T细胞的早期活化、抗肿瘤效应细胞因子分泌和脱颗粒能力. 这些结果显示 α -KIV显著促进小鼠Naïve CD8⁺ T细胞功能.

TCR信号转导在T细胞活化、识别抗原并发挥抗肿瘤功能的过程中发挥关键作用. 为了进一步探讨

α -KIV对TCR信号转导的影响, 采用500 $\mu\text{mol/L}$ α -KIV处理Jurkat T细胞24 h, 使用CD3 ϵ 抗体激活TCR, Western Blot检测 α -KIV对TCR信号转导的影响. 结果显示, α -KIV处理提高了TCR近膜信号中CD3 ζ 的蛋白水平, 显著抑制其Y142位的磷酸化. 此外, 信号下游的丝氨酸/苏氨酸激酶AKT的磷酸化水平在被 α -KIV处理后也受到略微抑制(图3). 综上所述, α -KIV能够抑制TCR信号转导.

3.2.2 α -KG调控P4HA2羟基化和Hedgehog信号

脯氨酸羟基化酶按底物可分为两大类: 催化HIF羟基化的HIF-PHDs和催化胶原蛋白的Collagen-PHDs (C-P4Hs). 不同于HIF-PHDs, 对C-P4Hs及其底物和调控机制的研究还比较少. C-P4Hs在多种肿瘤中显著上调, 与疾病的进程密切相关. 在乳腺癌中, 上调的P4HA1会消耗大量的 α -KG, 使HIF-PHDs的活性降低, 导致HIF-1 α 在肿瘤细胞中积累, 促进肿瘤恶性增殖与耐药^[25]. 在慢性胆汁性淤积肝病中, P4HA2的上调会

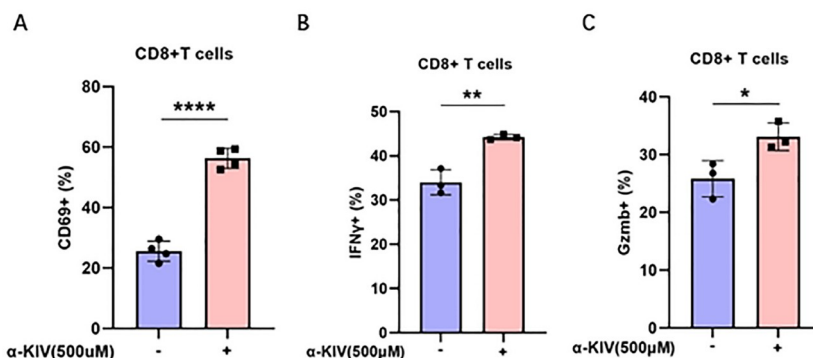


图 2 (网络版彩图)经CD3ε和CD28抗体刺激后,代谢物α-KIV (500 μmol/L)处理48 h对小鼠Naive CD8⁺ T细胞表面分子CD69 (A)和功能性因子IFN-γ (B)、Granzyme B (C)水平的影响

Figure 2 (Color online) Effects of α-KIV (500 μmol/L) on CD69 (A), IFN-γ (B) and Granzyme B (C) levels in murine Naive CD8⁺ T cells that has been activated by CD3ε and CD28 antibody stimulation (5 μg/mL) for 48 h.

羟甲基化Hippo通路的负调控蛋白萨尔瓦多同源1 (Salvador Homolog 1, SAV1), 促进其多聚泛素化并进入蛋白酶体途径降解, 从而活化Hippo通路介导的胆管反应^[26].

胶原蛋白羟甲基化酶P4HA2被报道在多种肿瘤中上调表达, 与肿瘤发生发展密切相关. 但除胶原蛋白外, 所知P4HA2的底物及调控机制十分有限, 限制了将其作为肿瘤干预靶标的开发. Hedgehog信号通路是进化上非常保守的一条信号通路, 在胚胎发育、组织再生以及肿瘤形成等过程中都扮演着重要角色^[27]. 我们的研究发现, Hedgehog信号转导在脯氨酸羟甲基化酶P4HA2敲除的细胞中受到显著抑制. 并且, 在野生型和

P4HA2基因敲除的NIH/3T3细胞中, 经α-KG的类似物DMOG的预处理可以显著抑制细胞中Hedgehog信号通路的激活, 并且该效应在P4HA2敲除后消失(图4). 这强调依赖于α-KG的P4HA2羟甲基化酶活是其调控Hedgehog信号的关键. 进一步研究揭示, 在Hedgehog通路激活后, P4HA2会与驱动蛋白家族成员7 (kinesin family member 7, KIF7)共同转位至纤毛尖端, 羟甲基化Hedgehog通路的融合抑制因子(suppressor of fused, SUFU)并抑制其功能, 从而正向调控Hedgehog信号转导^[28].

筛选α-KG的不可代谢类似物是开发针对PHD家族抑制剂的一种策略. 2018年, 由阿斯利康和珐博进合作研发的罗沙司他胶囊, 作为全球首个治疗肾性贫血的小分子药物在中国完成临床试验并批准上市, 用于肾性贫血的治疗^[29]. 罗沙司他作为α-KG的不可代谢类似物, 可以抑制PHDs的活性, 从而促进HIF-1α下游的造血等功能. 然而, α-KG作为一大类酶共用的底物, 抑制其功能必然存在潜在的副作用, 因此研发更高特异性的抑制剂仍然是亟待解决的问题. P4HA2作为调控Hedgehog信号转导的重要羟甲基化酶, 有潜力成为Hedgehog通路相关疾病的靶点. 目前尚无特异性抑制剂. 我们通过虚拟筛选、生物活性筛选、化学改造等方式, 获得了一系列有潜力的P4HA2小分子抑制剂库. 其中, 化合物#11相比于已有的GLI1抑制剂GANT61和P4HA2抑制剂EDHB, 在更低的浓度下具有更好的Hedgehog抑制能力(图5左), 并且有良好的肿瘤抑制活性(图5右), 为开发新一代P4HA2抑制剂提供新颖骨架

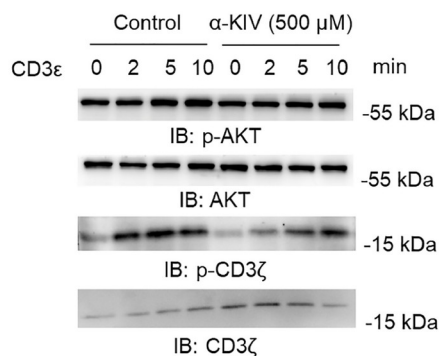


图 3 代谢物α-KIV (500 μmol/L)处理Jurkat T细胞24 h, 经CD3ε抗体刺激0、2、5、10 min后, CD3ζ和AKT及其磷酸化蛋白的表达水平

Figure 3 Jurkat T cells were treated with α-KIV (500 μmol/L) for 24 h, the expression of CD3ζ, AKT and the phosphorylated protein expression were detected after 0, 2, 5 and 10 min stimulation by CD3ε antibody.

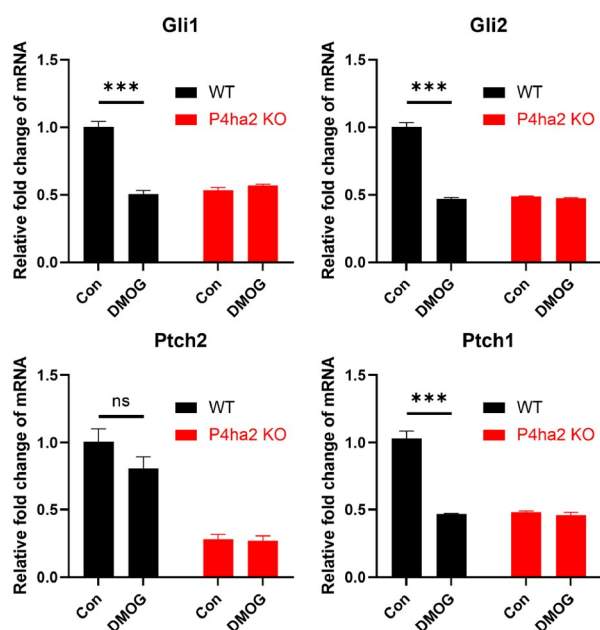


图4 (网络版彩图) α -KG类似物DMOG抑制羟甲基化酶P4HA2对Hedgehog信号转导的调控

Figure 4 (Color online) Regulation of Hedgehog signaling by inhibition of P4HA2 by α -KG analog DMOG.

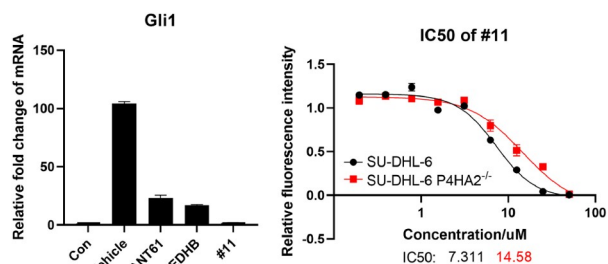


图5 (网络版彩图) P4HA2抑制剂#11展现出Hedgehog信号转导抑制能力与肿瘤抑制活性

Figure 5 (Color online) P4HA2 inhibitor #11 demonstrates Hedgehog signaling inhibition and tumor suppressive activity.

和候选分子。

3.2.3 天然代谢物调控蛋白质泛素化和蛋白水平

天然代谢产物是传统医药的疾病干预基础, 但其作用机制不明阻碍了其在现代医药发挥广泛作用。我们开展的天然产物调控PTM的研究为天然代谢产物干预疾病提供了有效策略。

用具有抗阿尔兹海默(Alzheimer disease, AD)活性的系列天然植物次生代谢物处理细胞, 发现具有增强蛋白质泛素化的能力(图6), 提示它们可能通过蛋白质

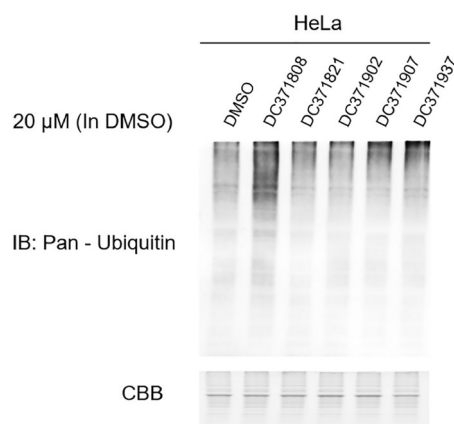


图6 抗AD天然植物次生代谢物(20 μ mol/L)增强蛋白泛素化

Figure 6 Anti-AD plants metabolites enhance protein ubiquitination in HeLa.

泛素化修饰参与蛋白质降解。

与上述结果一致, 抗AD化合物LH2-051对5月龄APP/PS1小鼠腹腔给药(10 mg/kg, 两天给药1次)后, 小鼠大脑海马和皮质中A β 斑块明显降低(图7a)。通过影像学检测发现, 与对照组相比, LH2-051治疗后皮层A β 面积减少63.2%, 海马中A β 面积减少65.6% (图7b, c)。酶联免疫吸附实验(ELISA)定量发现, 与对照组相比, LH2-051治疗后皮层A β 含量减少45.6%, 海马中A β 含量减少49.6% (图7d, e)。

3.3 化学遗传学助力创新药物研发

3.3.1 高通量筛选发现TRPV3抑制剂

TRPV3是瞬时受体电位香草酸通道(TRP vanilloid, TRPV)家族的6个成员之一, 前期研究发现TRPV3的功能障碍会导致多种皮肤病, 然而由于缺乏高亲和力和高选择性的TRPV3小分子抑制剂, TRPV3作为潜在治疗靶点的研究受到了严重阻碍。我们通过对包含11万个化合物的分子库开展高通量药物筛选, 鉴定发现化合物Trpvicin是一种高亲和力TRPV3拮抗剂, 且具有较高特异性(图8)。随后我们在动物模型上验证了Trpvicin的功能, 发现Trpvicin能够有效缓解小鼠皮炎引发的慢性和急性瘙痒; 对于TRPV3突变引起的脱发也有很好的治疗效果。为进一步阐明Trpvicin发挥作用的机制, 我们利用低温冷冻电镜技术解析了人源TRPV3-Trpvicin复合物高分辨率电镜结构, 并详细阐释了Trpvicin实现亚型选择性的分子机制, 为深入理

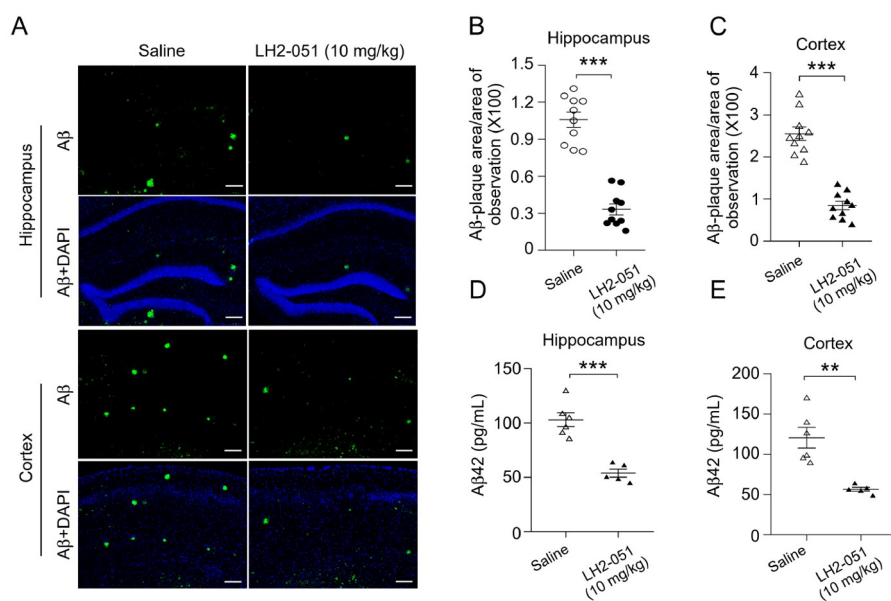


图 7 (网络版彩图) 化合物LH2-051显著降低APP/PS1小鼠脑内Aβ蛋白. (A) 海马区和大脑皮层免疫荧光图, 标尺: 500 μm. (B) 海马区Aβ面积. (C) 皮层Aβ面积. (D) 海马区Aβ42 ELISA; (E) 皮层Aβ42 ELISA

Figure 7 (Color online) Compound LH2-051 decreased Aβ protein levels in APP/PS1 mouse brain. (A) Immunofluorescence of hippocampus and cortex (scale bar: 500 μm). (B) Aβ plaque area of hippocampus. (C) Aβ42 plaque area of cortex. (D) Aβ42 ELISA of hippocampus. (E) Aβ42 ELISA of cortex.

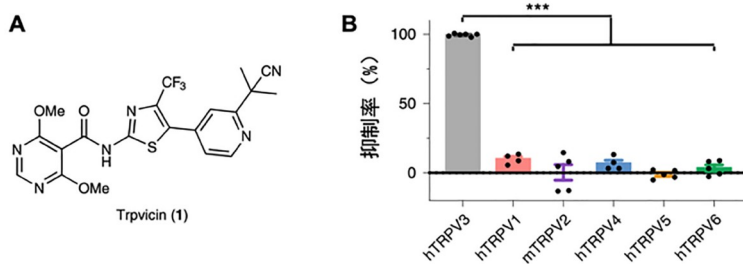


图 8 (网络版彩图) Trpvicin为TRPV3的选择性小分子抑制剂^[2]. (A) Trpvicin的化学结构式; (B) Trpvicin对TRPV家族蛋白的抑制率

Figure 8 (Color online) Trpvicin is a selective TRPV3 small-molecule inhibitor ^[2]. (A) Chemical structure of Trpvicin. (B) Inhibition rate of Trpvicin for proteins from the TRPV family.

解TRPV3突变的致病机制及相关的药物开发提供了新的思路^[2].

3.3.2 高通量筛选菌源DPP4的小分子抑制剂

菌源宿主同工酶在肠道中广泛存在, 可以模拟宿主酶的功能, 参与疾病的发生发展. 其中, 菌源二肽基肽酶4 (DPP4)是一种重要的同工酶, 可以在肠屏障损伤条件下进入肠组织, 降解宿主活性GLP-1, 诱导糖耐量异常. 宿主DPP4抑制剂西格列汀无法有效抑制菌源DPP4活性, 是西格列汀临床治疗响应性个体差异大的

重要原因. 因此我们通过高通量药物筛选, 发现了首个对菌源DPP4具有高活性和强选择性的天然产物衍生物Daurisoline-d4 (Dau-d4) (图9). Dau-d4可以通过特异性抑制菌源DPP4, 改善糖耐量异常, 从而对2型糖尿病具有潜在的治疗效果, 为后续基础研究与临床治疗提供了新的研究思路与方向^[3].

4 结论

我们的发现表明, 代谢物通过多种途径调控PTM

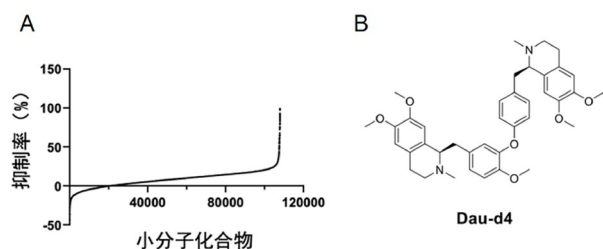


图9 (网络版彩图)高通量筛选发现菌源DPP4的小分子抑制剂Dau-d4^[3]. (A) 筛选结果; (B) Dau-d4的结构式

Figure 9 (Color online) High-throughput screening identified Dau-d4 as an inhibitor for bacterial DPP4 [3]. (A) Screening results; (B) chemical structure of Dau-d4.

和细胞生理病理状态. 在蛋白质翻译后修饰层面, 代谢物可以作为供体直接参与PTM, 将对应代谢物信号整合到蛋白质功能和细胞信号通路, 如细胞代谢中间产物乙酰辅酶A和巴豆酰辅酶A均能作为酰基供体驱动细胞周期依赖的EB1蛋白的乙酰化修饰和巴豆酰化修饰, 通过调控微管骨架的动态性维系基因组的稳定性.

此外, 代谢物可以参与调控与其结构不相关的PTM过程. α -KIV和 α -KG能够分别调控TCR通路磷酸化信号和P4HA2羟基化介导的Hedgehog信号. 这些发现为代谢物调控细胞生理病理的研究打开了新的角度和视野.

尤为重要的是, 传统药材中的天然产物也参与了细胞PTM和生理病理调控机制, 天然植物次生代谢物能够增加AD相关病理蛋白的泛素化降解, 为药材的药理研究提供了理论支持. 天然产物参与翻译后修饰的发现不但为传统医药赋予了现代科技内核, 还为中医药现代化开辟了新路径. 此外, 本研究基于高通量筛选技术, 以代谢物的结构为参照, 以PTM相关的修饰酶和去修饰酶以及参与调控PTM的所有其他蛋白为潜在的干预靶标, 筛选致病相关蛋白的特异性小分子抑制剂, 为探索药物新靶标及干预策略提供了新方向. 在未来的先导化合物筛选中, PTM改变可以成为行之有效的筛选指针.

参考文献

- Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, Yu W, Li Z, Gong L, Peng Y, Ding J, Lei Q, Guan KL, Xiong Y. *Science*, 2009, 324: 261–265
- Chantranupong L, Wolfson RL, Sabatini DM. *Cell*, 2015, 161: 67–83
- He XD, Gong W, Zhang JN, Nie J, Yao CF, Guo FS, Lin Y, Wu XH, Li F, Li J, Sun WC, Wang ED, An YP, Tang HR, Yan GQ, Yang PY, Wei Y, Mao YZ, Lin PC, Zhao JY, Xu Y, Xu W, Zhao SM. *Cell Metab*, 2018, 27: 151–166.e6
- Li F, He X, Ye D, Lin Y, Yu H, Yao C, Huang L, Zhang J, Wang F, Xu S, Wu X, Liu L, Yang C, Shi J, He X, Liu J, Qu Y, Guo F, Zhao J, Xu W, Zhao S. *Mol Cell*, 2015, 60: 661–675
- Mei X, Qi D, Zhang T, Zhao Y, Jin L, Hou J, Wang J, Lin Y, Xue Y, Zhu P, Liu Z, Huang L, Nie J, Si W, Ma J, Ye J, Finnell RH, Saiyin H, Wang H, Zhao J, Zhao S, Xu W. *EMBO Mol Med*, 2020, 12: e9469
- Hu SH, He XD, Nie J, Hou JL, Wu J, Liu XY, Wei Y, Tang HR, Sun WX, Zhou SX, Yuan YY, An YP, Yan GQ, Lin Y, Lin PC, Zhao JJ, Ye ML, Zhao JY, Xu W, Zhao SM. *Cell Rep*, 2022, 38: 110509
- Mao Y, Zhang J, Zhou Q, He X, Zheng Z, Wei Y, Zhou K, Lin Y, Yu H, Zhang H, Zhou Y, Lin P, Wu B, Yuan Y, Zhao J, Xu W, Zhao S. *Cell Res*, 2024, 34: 13–30
- Sabari BR, Tang Z, Huang H, Yong-Gonzalez V, Molina H, Kong HE, Dai L, Shimada M, Cross JR, Zhao Y, Roeder RG, Allis CD. *Mol Cell*, 2015, 58: 203–215
- Aiyama T, Orimo T, Yokoo H, Ohata T, Hatanaka KC, Hatanaka Y, Fukai M, Kamiyama T, Taketomi A, Lee JW. *PLoS ONE*, 2020, 15: e0239462
- Song X, Yang F, Liu X, Xia P, Yin W, Wang Z, Wang Y, Yuan X, Dou Z, Jiang K, Ma M, Hu B, Zhang R, Xu C, Zhang Z, Ruan K, Tian R, Li L, Liu T, Hill DL, Zang J, Liu X, Li J, Cheng J, Yao X. *Nat Chem Biol*, 2021, 17: 1314–1323
- Xia P, Liu X, Wu B, Zhang S, Song X, Yao PY, Lippincott-Schwartz J, Yao X, Zheng Y. *Mol Biol Cell*, 2014, 25: 4166–4173
- Xia P, Wang Z, Liu X, Wu B, Wang J, Ward T, Zhang L, Ding X, Gibbons G, Shi Y, Yao X. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 16564–16569
- Huang S, Wang Z, Zhao L. *Cancer Manag Res*, 2021, Volume 13: 6291–6307
- Newman DJ, Cragg GM. *J Nat Prod*, 2020, 83: 770–803
- Fan J, Hu L, Yue Z, Liao D, Guo F, Ke H, Jiang D, Yang Y, Lei X. *Nat Chem Biol*, 2023, 19: 81–90

- 16 Wang K, Zhang Z, Hang J, Liu J, Guo F, Ding Y, Li M, Nie Q, Lin J, Zhuo Y, Sun L, Luo X, Zhong Q, Ye C, Yun C, Zhang Y, Wang J, Bao R, Pang Y, Wang G, Gonzalez FJ, Lei X, Qiao J, Jiang C. *Science*, 2023, 381: eadd5787
- 17 Hogg SJ, Beavis PA, Dawson MA, Johnstone RW. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19: 776–800
- 18 Franzini RM, Neri D, Scheuermann J. *Acc Chem Res*, 2014, 47: 1247–1255
- 19 Belyanskaya SL, Ding Y, Callahan JF, Lazaar AL, Israel DI. *ChemBioChem*, 2017, 18: 837–842
- 20 Harris PA, Berger SB, Jeong JU, Nagilla R, Bandyopadhyay D, Campobasso N, Capriotti CA, Cox JA, Dare L, Dong X, Eidam PM, Finger JN, Hoffman SJ, Kang J, Kasparcova V, King BW, Lehr R, Lan Y, Leister LK, Lich JD, MacDonald TT, Miller NA, Ouellette MT, Pao CS, Rahman A, Reilly MA, Rendina AR, Rivera EJ, Schaeffer MC, Schon CA, Singhaus RR, Sun HH, Swift BA, Totoritis RD, Vossenkämper A, Ward P, Wisnoski DD, Zhang D, Marquis RW, Gough PJ, Bertin J. *J Med Chem*, 2017, 60: 1247–1261
- 21 Cuozzo JW, Clark MA, Keefe AD, Kohlmann A, Mulvihill M, Ni H, Renzetti LM, Resnicow DI, Ruebsam F, Sigel EA, Thomson HA, Wang C, Xie Z, Zhang Y. *J Med Chem*, 2020, 63: 7840–7856
- 22 Brownlie RJ, Zamoyska R. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13: 257–269
- 23 Feng Q, Liu Z, Yu X, Huang T, Chen J, Wang J, Wilhelm J, Li S, Song J, Li W, Sun Z, Sumer BD, Li B, Fu YX, Gao J. *Nat Commun*, 2022, 13: 4981
- 24 Wang H, Rong X, Zhao G, Zhou Y, Xiao Y, Ma D, Jin X, Wu Y, Yan Y, Yang H, Zhou Y, Qian M, Niu C, Hu X, Li DQ, Liu Q, Wen Y, Jiang YZ, Zhao C, Shao ZM. *Cell Metab*, 2022, 34: 581–594.e8
- 25 Xiong G, Stewart RL, Chen J, Gao T, Scott TL, Samayoa LM, O'Connor K, Lane AN, Xu R. *Nat Commun*, 2018, 9: 4456
- 26 Zhang J, Lyu Z, Li B, You Z, Cui N, Li Y, Li Y, Huang B, Chen R, Chen Y, Peng Y, Fang J, Wang Q, Miao Q, Tang R, Gershwin ME, Lian M, Xiao X, Ma X. *Hepatology*, 2023, 78: 10–25
- 27 Zhang Y, Beachy PA. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24: 668–687
- 28 Li Q, Liu Y, Wu J, Zhu Z, Fan J, Zhai L, Wang Z, Du G, Zhang L, Hu J, Ma DK, Liu JO, Huang H, Tan M, Dang Y, Jiang W. *Leukemia*, 2024, 38: 1751–1763
- 29 Besarab A, Chernyavskaya E, Motylev I, Shutov E, Kumbar LM, Gurevich K, Chan DTM, Leong R, Poole L, Zhong M, Saikali KG, Franco M, Hemmerich S, Yu KHP, Neff TB. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27: 1225–1233

Novel mechanisms of protein post-translational modifications regulated by multiple metabolites and strategies for drug screening

Siyuan Yang¹, Zewen Zhu², Yingxu Chen³, Fengrui Yang⁴, Xinyuan Wu^{5,6}, Jiang Wang⁵, Wenyang Li⁷, Weiwei Yang^{3*}, Xiaoyu Song^{4*}, Xiaojie Lu^{5,6*}, Hong Liu^{5*}, Wei Jiang^{2*}, Xiaoguang Lei^{7*}, Shimin Zhao^{1*}

¹ Shanghai Key Laboratory of Metabolic Remodeling and Health, Institute of Metabolism and Integrative Biology, Shanghai 200032, China

² Key Laboratory of Metabolism and Molecular Medicine, Ministry of Education, Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China

³ Key Laboratory of Systems Health Science of Zhejiang Province, School of Life Science, Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310024, China

⁴ Hefei National Research Center for Physical Sciences at the Microscale, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China

⁵ State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

⁶ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

⁷ Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, Key Laboratory of Bioorganic Chemistry and Molecular Engineering of Ministry of Education, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

*Corresponding authors (email: weiweiyang@sibcb.ac.cn; sonxiaoyu@ustc.edu.cn; xjlu@simm.ac.cn; hliu@simm.ac.cn; jiangw@fudan.edu.cn; xglei@pku.edu.cn; zhaosm@fudan.edu.cn)

Abstract: Metabolites are the primary donors for the modification of biomacromolecules, and changes in metabolites caused by environmental or cellular stress signals are also integrated into life signal networks. Classical post-translational modifications (PTMs), such as protein phosphorylation, acetylation, and methylation use energy or substance-indicating metabolites like ATP, acetyl-CoA, and S-adenosyl methionine (SAM) as substrates to convey common metabolic signals. Our research has found that metabolites can regulate other PTMs through different mechanisms outside of their role as donors: Crotonyl-CoA can act as an acyl donor to promote the crotonylation of cell cycle-dependent EB1 protein, maintaining genomic stability; α -KIV and α -KG can respectively regulate protein phosphorylation and hydroxylation modifications, mediating TCR signaling pathways and Hedgehog signaling pathway. In addition, natural metabolites can also promote the ubiquitination and degradation of AD-related proteins. Based on the new mechanisms of metabolite regulation of post-translational modifications, we have high-throughput screened small molecule inhibitors of the transient receptor potential vanilloid channel 3 protein (TRPV3) and dipeptidyl peptidase-4 (DPP4), using key proteins in pathological processes as examples, providing new ideas for the development of innovative drugs and the intervention of diseases.

Keywords: biomacromolecules, post-translational modification, metabolite regulation, cell signaling, intervening

doi: [10.1360/SSC-2024-0223](https://doi.org/10.1360/SSC-2024-0223)