

非经典泛素化的研究进展

杨昱鸽^{1#}, 张文阳^{1#}, 李振斐^{1,2}, 盛相鹏^{1,2*}, 胡荣贵^{1,2*}

(¹中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海 200032; ²中国科学院大学杭州高等研究院, 杭州 310024)

摘要: 泛素化是真核生物最普遍最重要的翻译后修饰之一, 控制基因转录表达、细胞生长死亡、分子运输、代谢、发育和免疫反应等大多数生理过程。经典泛素系统的通路和机制越来越明晰, 同时非经典的泛素化也逐渐被发现。本文将对经典泛素系统进行简单回顾, 并且对非蛋白底物泛素化、非赖氨酸位点泛素化、非经典E3泛素连接酶等最新非经典泛素化进行阐述。

关键词: 泛素; 泛素化; E3泛素连接酶

Advances of nonclassical ubiquitination

YANG Yuge^{1#}, ZHANG Wenyang^{1#}, LI Zhenfei^{1,2}, SHENG Xiangpeng^{1,2*}, HU Ronggui^{1,2*}

(¹Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China;

²Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310024, China)

Abstract: Ubiquitination is one of the most common and important post-translational modifications in eukaryotes, controlling most cellular processes, such as gene transcriptional expression, cell growth and death, molecular transport, metabolism, development and immune response. In recent years, the pathways and mechanisms of the classical ubiquitin system have become increasingly clear, while non-classical ubiquitination has also been gradually discovered. Here, we will briefly review the classic ubiquitin system, and describe the latest non-classical ubiquitination, including non-protein substrate ubiquitination, non-lysine site ubiquitination and non-classical E3 ubiquitin ligases.

Key Words: ubiquitin; ubiquitination; E3 ubiquitin ligases

1 泛素系统概述

泛素化是最基本的蛋白质翻译后修饰之一, 几乎调节真核生物中每一个关键的细胞过程。泛素(ubiquitin, Ub)是一种具有76个氨基酸的高度稳定的蛋白质, 因为其在真核生物中普遍存在而得名。Ub的结构包含具有C端柔性尾巴的 β -grasp折叠和几个疏水表面, 从酵母到人类高度保守。泛素化是特定的三步酶促级联反应, 可以将泛素共价连接到蛋白质底物上。通常是泛素C末端的甘氨酸残基与蛋白底物赖氨酸的 ϵ -氨基形成异肽键并连接

在一起^[1]。泛素连接底物蛋白质的过程至少由三种酶协同进行: Ub激活酶(E1)、Ub结合酶(E2)和Ub连接酶(E3)^[2]。其中, E3泛素连接酶特异性识别底物并控制修饰过程, 在泛素系统中非常关键。E3泛素连接酶具有不同的与E2结合方式和泛素转移催化机制, 一般分为三大类: RING结构域E3泛素连接酶、HECT结构域E3泛素连接酶、RBR结构域E3泛素连接酶^[3]。如图1所示, RING结构域E3通过招募带有Ub的泛素结合酶E2, E3使E2与底物靠近, 催化E2将Ub转移到底物的赖氨酸残基上^[4]。

基金项目: 脑科学重大项目科技创新2030项目(2021ZD0203900); 国家自然科学基金重大研究计划集成项目(92253302); 科技部“蛋白质机器与生命过程调控”重点专项(2018YFA0508200)

共同第一作者: 杨昱鸽, E-mail: yangyuge2021@sibcb.ac.cn; 张文阳, E-mail: zhangwenyang2022@sibcb.ac.cn

***通信作者:** 盛相鹏, E-mail: shengxiangpeng@ucas.ac.cn; 胡荣贵, E-mail: coryhu@sibcb.ac.cn

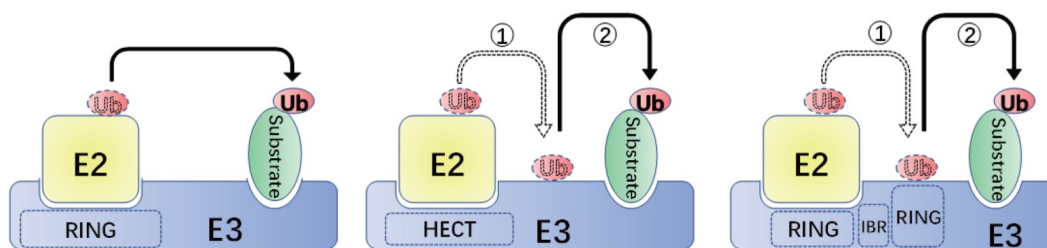


图1 三类E3泛素连接酶催化机制

HECT结构域E3首先与带有Ub的E2结合，再与E2携带的Ub形成硫酯键共价连接，然后E3将Ub转移给底物，催化底物泛素化^[5]。RBR结构域E3包含两个RING结构域，两个结构域之间以IBR(in-between RING)结构域相连，催化底物泛素化时，RING1结构域与带有Ub的E2连接，随后Ub转移到RING2的活性半胱氨酸残基上形成共价中间体，最后RBR催化Ub从RING2结构域转移到底物上^[6]。

2 非经典泛素化

2.1 非蛋白底物泛素化

在以往的研究中，蛋白质一直被认为是泛素化的唯一底物，但最近的研究将泛素化底物延伸到蛋白质以外的分子。

细菌入侵细胞的过程中，宿主的E3泛素连接酶线性泛素链组装复合物(linear ubiquitin chain assembly complex, LUBAC)在泛素外壳中产生线性多聚泛素，它们为抗菌和促炎提供信号平台。LUBAC合成的多聚泛素分别招募Optineurin和Nemo激活异体自噬(autophagy)和核因子- κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)信号通路，抑制细菌增殖^[7]。但是LUBAC需要通过细菌上已存在的泛素来进行自身招募，说明细菌的泛素外壳需要一系列的E3泛素连接酶共同产生。此外，细菌上的泛素化底物一直没有定论，有猜想认为泛素是直接和细菌蛋白结合，也可能是细胞内泛素化的蛋白与细菌结合^[8]。Otten等^[9]报道了一种在沙门氏菌感染过程中的非蛋白底物泛素化。RNF213是公认的最大的人类E3泛素连接酶，相对分子质量接近600 000，参与脂滴形成、细胞死亡和NF- κ B信号转导等重要生理过程。如图2所示，细胞被细菌感染时，E3泛素连接酶RNF213催化细菌脂多糖

(lipopolysaccharide, LPS)泛素化，并且招募LUBAC，触发细胞自主免疫，而在敲除RNF213的细胞中，LPS则不会发生泛素化^[9]。这表明RNF213在LPS泛素化过程中发挥重要作用。RNF213催化LPS泛素化过程中，主要依赖于RZ-finger结构域，而不是RING结构域，这之前关于RNF213的非RING自泛素化结论一致。蛋白质泛素化通常是修饰在氨基或者羟基上，分别产生酰胺或酯连接的复合物，但是LPS的核心组成部分不包含适合泛素化的氨基。通过体外纯化RNF213重组蛋白发现，RNF213需要在ATP、E1和E2同时存在时，才能催化从宿主细胞中提取的细菌上的LPS泛素化，从而证实了该泛素化遵循经典的反应模式。同时，RNF213还泛素化了纯化的LPS和脂质A，证实了RNF213是LPS真正的E3泛素连接酶，并揭示了LPS泛素化修饰是在脂质A。

在真核生物中，同样发现了非蛋白底物泛素化。Sakamaki等^[10]报道了一种生物膜组分上的磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine, PE)泛素化。他们首先从酿酒酵母中纯化出了疏水泛素，并确定该泛素修饰发生在膜组分中，使用磷脂酶D处理证明泛素是与磷脂结合。他们进一步研究发现，当泛素C-末端第76位甘氨酸(Gly76)被删除时，泛素化无法被检测到。这些结果表明，在酵母中泛素分子的Gly76与磷脂结合，同时在HeLa细胞中也检测到类似的修饰。又通过质谱检测泛素连接底物确认泛素C末端多肽连接的是PE。将酵母膜组分密度梯度离心，最终泛素化的PE(Ub-PE)定位到酵母的液泡(vacuole)和内吞体，在HeLa细胞中Ub-PE也定位于核内体(endosome)和溶酶体。如图3所示，Ub-PE是由典型的泛素系统酶Uba1(E1)、Ubc4/5(E2)、Tul1(E3)(RING结构)催化，将泛素分子转移到核内体和酵母中的PE，Ub-PE还可以被

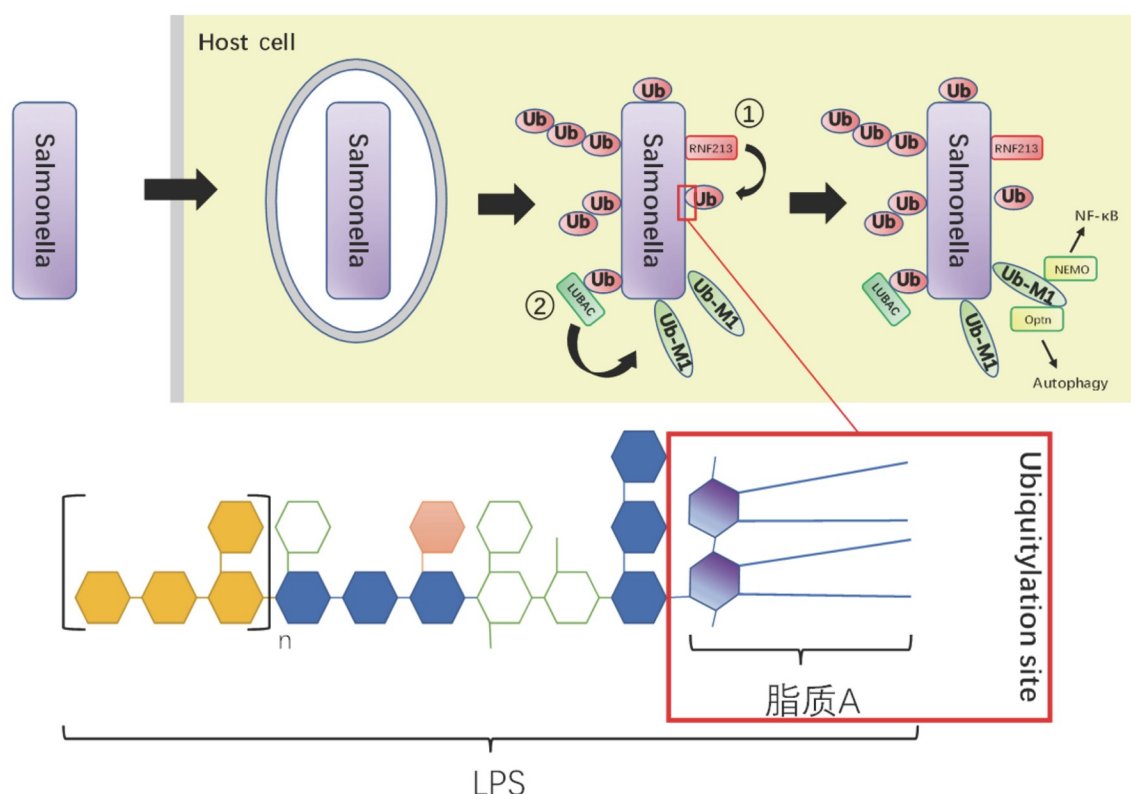


图2 沙门氏菌脂多糖(LPS)泛素化机制

Doa4去泛素化, 进而调节ESCRT组分的招募^[10]。PE的泛素化在生理条件下就会发生, 且在氮饥饿、mTOR抑制、溶酶体损伤等情况下加强。此外, 其他的类泛素蛋白NEDD8和ISG15也可以与磷脂共价结合, 因此脂质正在成为一种新的泛素化底物。

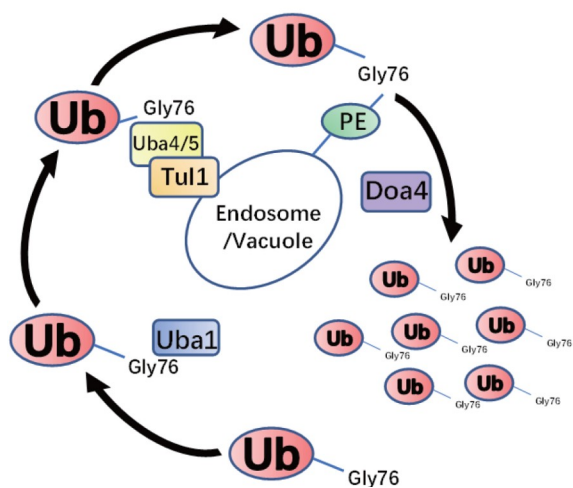


图3 磷脂酰乙醇胺(PE)泛素化模型

2.2 非赖氨酸位点泛素化

几十年来, 赖氨酸残基侧链上的 ϵ -氨基被认为是发生泛素化的唯一典型位点, 但近几年其他氨基酸上的非赖氨酸泛素化已经得到证实, 并被报道可以调节多种生理活动^[11]。例如, HECT结构域E3泛素连接酶神经前体细胞表达发育调控样基因4 (neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated gene 4-like, NEDD4L)对肿瘤坏死因子受体作用因子3(TNF receptor associated factor 3, TRAF3)的半胱氨酸泛素化, 启动其他E3泛素连接酶修饰底物, 正向调节抗病毒天然免疫^[12]。小鼠 γ -疱疹病毒蛋白mK3是一种病毒RING结构域类E3泛素连接酶, 对组织相容性复合体 I (major histocompatibility complex I, MHC I)类分子的重链(HC)尾巴上的丝氨酸、苏氨酸或赖氨酸进行泛素修饰, 每个残基都会诱导HC快速降解, 从而阻断宿主细胞的免疫检查^[13]。此外, 翻译起始的甲硫氨酸游离氨基或底物的第二位氨基酸(去除甲硫氨酸的情况下)可以作为N端泛素化位点^[14]。

3 非经典E3泛素连接酶

除了RING结构域E3、HECT结构域E3和RBR结构域E3以外,在过去十年中科学家们还报道了一些非经典E3泛素连接酶。

许多细菌病原体可以利用毒力效应因子、去泛素化酶或直接攻击泛素酶来破坏泛素信号。致病肺炎军团菌利用大约300个效应因子,包括至少10种参与泛素操纵的蛋白质,在宿主细胞中复制,促进病原菌的传染性,从而干扰宿主细胞的细胞功能^[15]。SidE效应蛋白家族成员是一种E3泛素连接酶,这类酶可以发生不依赖于E1、E2的泛素化,该泛素化被烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)形成的ADP-核糖基化泛素激活^[16]。SdeA是SidE家族成员,它的催化区域包含两个不同的功能单元,一个单ADP-核糖基转移酶(mART)结构和一个磷酸二酯酶结构(phosphodiesterase, PDE),mART介导Ub转化为ADP-核糖基化泛素(ADPR-Ub),PDE通过磷酸二酯键断裂将ADPR-Ub转化为磷酸核糖泛素(PR-Ub),并通过两步转移反应催化PR-Ub与底物丝氨酸的共价连接^[17]。PR-Ub的组分分析结果发现,它还可能调节自噬、作用于高尔基体或线粒体蛋白,表明PR-Ub可能对宿主细胞有更广泛更深远的影响。目前在(未感染的病原菌的)真核生物中还未发现PR-Ub,但许多SidE效应蛋白在进化上具有真核生物起源^[18],提示真核生物中可能存在类似的泛素化机制,为真核生物PR-Ub提供研究基础。有研究还报道了两种可以逆转PR泛素化的去泛素化酶(DupA和DupB),DupA具有一个和SidE高度同源的PDE结构域,并且对PR表现出更高的亲和力,所以DupA可以切割PR-Ub,调节SidE催化PR泛素化的动态过程^[19]。此外,还有人提出与SidE共享基因位点的效应基因SidJ可以拮抗SidE的作用。SidJ具有经典的去泛素酶活性,但不需要催化半胱氨酸残基,通过切割PR-Ub逆转SidE对底物的泛素化修饰^[20]。但后来证明,SidJ是一种谷氨酰化酶,它的活性依赖于与钙调素相互作用,细胞内的Ca²⁺浓度可以调节其活性。在被肺炎军团菌感染的细胞中,SidJ介导病原菌液泡表面的SidE谷氨

酰化,从而抑制SidE的泛素连接酶活性,这些靶点的研究有助于阐明病原菌感染中宿主-病原体相互作用^[21]。

在人类细胞中,也有一些非经典的E3泛素连接酶被发现。Hewings等^[22]利用一种生物素活性探针(ABPs),分析HECT/RBR E3的转硫化活性,结合质谱技术进一步分析神经母细胞瘤细胞提取物中的E3活性。在实验过程中,他们意外富集到了33个缺乏HECT/RBR结构域的RING E3泛素连接酶,并从中挑选了神经元相关的E3泛素连接酶MYCBP2做进一步研究^[23]。MYCBP2有酯化活性,其中C4520为催化活性位点,对苏氨酸和丝氨酸具有内在选择性,并且对苏氨酸的选择性更强。质谱定量结果显示,MYCBP2对苏氨酸的选择性相比于丝氨酸提高了大约10倍,在肽环境中,对苏氨酸的选择性也保持了3倍。此外,在MYCBP2存在下,赖氨酸的基础泛素化被部分抑制,这表明其缺乏对赖氨酸的活性。MYCBP2包含两个必需的半胱氨酸,形成串联半胱氨酸,它们通过硫酯中间体将泛素转移到底物非赖氨酸位点上,同时降低赖氨酸活性,该过程依赖于一个封闭的E2-Ub复合物, helix-coil转换促进Ub转移,根据MYCBP2的结构学特征,将该泛素化机制命名为RING-Cys-relay(RCR)^[24]。MYCBP2的酯化活性可调节神经发育和轴突完整性,在RCR缺陷小鼠中,会出现神经发育缺陷,这可能为治疗神经系统疾病提供新的策略。

4 结语

随着更多非经典泛素化的发现,泛素化底物、E3泛素连接酶的多样性逐渐展现,更复杂的泛素网络及其在生物体内的功能和调节机制都需要得到更加深入的研究。这将为泛素系统研究提供更多新的方向,也为诸多复杂的生理活动、疾病机理和临床治疗等提供新的研究思路。可以期待,未来将会有更多的非经典泛素化被鉴定和研究。

谨以此文纪念中国生物化学和酶学领域的奠基人邹承鲁先生诞辰100周年

参考文献

- [1] Komander D. The emerging complexity of protein

- ubiquitination. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37(5): 937-953
- [2] Weissman AM. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(3): 169-178
- [3] Morreale FE, Walden H. Types of ubiquitin ligases. *Cell*, 2016, 165(1): 248-248.e1
- [4] Deshaies RJ, Joazeiro CAP. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem*, 2009, 78(1): 399-434
- [5] Verdecia MA, Joazeiro CAP, Wells NJ, et al. Conformational flexibility underlies ubiquitin ligation mediated by the WWP1 HECT domain E3 ligase. *Mol Cell*, 2003, 11(1): 249-259
- [6] Wang P, Dai X, Jiang W, et al. RBR E3 ubiquitin ligases in tumorigenesis. *Semin Cancer Biol*, 2020, 67: 131-144
- [7] Noad J, von der Malsburg A, Pathe C, et al. LUBAC-synthesized linear ubiquitin chains restrict cytosol-invading bacteria by activating autophagy and NF- κ B. *Nat Microbiol*, 2017, 2(7): 17063
- [8] Veiga E and Cossart P. Ubiquitination of intracellular bacteria: a new bacteria-sensing system? *Trends Cell Biol*, 2005, 15(1): 2-5
- [9] Otten EG, Werner E, Crespillo-Casado A, et al. Ubiquitylation of lipopolysaccharide by RNF213 during bacterial infection. *Nature*, 2021, 594(7861): 111-116
- [10] Sakamaki J, Ode KL, Kurikawa Y, et al. Ubiquitination of phosphatidylethanolamine in organellar membranes. *Mol Cell*, 2022, 82(19): 3677-3692.e11
- [11] Squair DR, Virdee S. A new dawn beyond lysine ubiquitination. *Nat Chem Biol*, 2022, 18(8): 802-811
- [12] Gao P, Ma X, Yuan M, et al. E3 ligase Nedd4l promotes antiviral innate immunity by catalyzing K29-linked cysteine ubiquitination of TRAF3. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1194
- [13] Wang X, Herr RA, Chua WJ, et al. Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. *J Cell Biol*, 2007, 177(4): 613-624
- [14] Akimov V, Barrio-Hernandez I, Hansen SVF, et al. UbiSite approach for comprehensive mapping of lysine and N-terminal ubiquitination sites. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25(7): 631-640
- [15] Qiu J, Luo ZQ. Legionella and Coxiella effectors: strength in diversity and activity. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(10): 591-605
- [16] Qiu J, Sheedlo MJ, Yu K, et al. Ubiquitination independent of E1 and E2 enzymes by bacterial effectors. *Nature*, 2016, 533(7601): 120-124
- [17] Akturk A, Wasilko DJ, Wu X, et al. Mechanism of phosphoribosyl-ubiquitination mediated by a single Legionella effector. *Nature*, 2018, 557(7707): 729-733
- [18] Burstein D, Amaro F, Zusman T, et al. Genomic analysis of 38 Legionella species identifies large and diverse effector repertoires. *Nat Genet*, 2016, 48(2): 167-175
- [19] Shin D, Mukherjee R, Liu Y, et al. Regulation of phosphoribosyl-linked serine ubiquitination by deubiquitinases DupA and DupB. *Mol Cell*, 2020, 77(1): 164-179
- [20] Qiu J, Yu K, Fei X, et al. A unique deubiquitinase that deconjugates phosphoribosyl-linked protein ubiquitination. *Cell Res*, 2017, 27(7): 865-881
- [21] Bhogaraju S, Bonn F, Mukherjee R, et al. Inhibition of bacterial ubiquitin ligases by SidJ-calmodulin catalysed glutamylation. *Nature*, 2019, 572(7769): 382-386
- [22] Hewings DS, Flygare JA, Bogoy M, et al. Activity-based probes for the ubiquitin conjugation-deconjugation machinery: new chemistries, new tools, and new insights. *FEBS J*, 2017, 284(10): 1555-1576
- [23] Pao KC, Wood NT, Knebel A, et al. Activity-based E3 ligase profiling uncovers an E3 ligase with esterification activity. *Nature*, 2018, 556(7701): 381-385
- [24] Mabbitt PD, Loreto A, D ry MA, et al. Structural basis for RING-Cys-Relay E3 ligase activity and its role in axon integrity. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(11): 1227-1236