



# 非经典泛素化修饰的机制及其生物学功能

陈文静<sup>1</sup>, 戴京<sup>1</sup>, 闫明<sup>1</sup>, 叶茂<sup>1,2\*</sup>

1. 湖南大学生物学院, 长沙 410082

2. 化学生物传感与计量学国家重点实验室, 长沙 410082

\*通讯作者, E-mail: goldleaf@hnu.edu.cn

收稿日期: 2024-09-30; 接受日期: 2024-11-21; 网络版发表日期: 2024-12-13

国家重点研发计划(编号: 2021YFA0909400)和国家自然科学基金(编号: 92253201, 32350026, 22334005)资助项目

**摘要** 泛素化修饰是一种依赖于能量消耗来对底物进行特异性修饰的翻译后修饰方式, 因其能够修饰众多的底物蛋白而在细胞的各项生命活动中发挥重要作用. 随着对经典泛素化研究的深入, 非经典泛素化修饰逐渐被发现, 并引起广泛关注. 非经典泛素化是一种新型的泛素修饰方式, 其在修饰过程中底物氨基酸残基的种类、泛素与底物连接的方式、底物类型、酶促反应过程等方面均不同于经典泛素化修饰. 非经典泛素化修饰可参与调节宿主-病原体互作、自噬、内质网相关降解、神经元活动等众多生命活动. 本综述总结了非经典泛素化研究的最新进展, 探讨了其在细胞中的作用机制和生物学功能, 为进一步理解泛素化修饰的复杂性及其在生命过程中的重要性提供了新的视角.

**关键词** 泛素化, 非经典, 翻译后修饰, 机制, 功能

## 1 引言

泛素化修饰作为一种重要的蛋白质翻译后修饰, 不仅控制蛋白质的降解, 还调控蛋白质的定位和功能活性, 广泛参与信号传递、细胞周期、细胞凋亡、免疫应答等多种生命活动<sup>[1]</sup>. 在经典的泛素化修饰过程中, 泛素分子在泛素活化酶E1、泛素结合酶E2、泛素连接酶E3等一系列酶的级联催化作用下, 连接在底物蛋白特定的赖氨酸残基上, 从而实现对底物蛋白的泛素化修饰<sup>[2]</sup>. 泛素化修饰可分为单泛素化和多聚泛素化修饰. 其中, 多聚泛素化修饰中, 依据泛素分子之间连接位点的不同, 可形成不同的泛素链类型, 并赋予底物蛋白不同的生物学功能<sup>[3]</sup>. 泛素化修饰与其他翻译

后修饰一样, 是可逆的动态化过程, 其去泛素化过程由去泛素化酶介导.

长期以来, 在泛素化研究中, 普遍认为泛素仅连接在底物的赖氨酸残基上, 然而近年来有研究发现泛素还可以连接在底物的半胱氨酸、丝氨酸和苏氨酸残基上, 甚至泛素化修饰可以发生在磷脂酰乙醇胺、脂质、多糖和核酸等多种非蛋白底物上. 同时, 也有研究报道不需要级联酶促反应和ATP的参与也能够实现对底物的泛素化修饰. 这些非经典泛素化修饰方式的发现极大地拓展了我们对泛素化修饰的认识, 凸显了泛素化修饰的复杂性和多样性.

非经典泛素化修饰是一种有效的调控策略, 在宿主-病原体互作、自噬、内质网相关降解和神经元活

引用格式: Chen W, Dai J, Yan M, Ye M. The mechanism and biological function of non-canonical ubiquitination. *Sci Sin Chim*, 2025, 55: 847–858, doi: 10.1360/SSC-2024-0231

动的调节等各项生理过程中发挥重要作用。深入研究非经典泛素化的分子机制, 将为理解泛素化修饰的复杂性提供新的见解, 并为疾病的治疗和控制开发新的策略和方法。

## 2 经典泛素化修饰的过程

真核生物泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)主要由泛素、泛素活化酶(ubiquitin-activating enzyme, E1)、泛素结合酶E2(ubiquitin-conjugating enzyme, E2)、泛素连接酶(ubiquitin-ligase enzyme, E3)、去泛素化酶(Deubiquitination enzymes, DUB)和26S蛋白酶体组成<sup>[4]</sup>。泛素是一种由76个氨基酸组成的小分子球状蛋白, 具有高度保守性和稳定性的特征, 并广泛分布在真核细胞中。泛素化过程是由E1、E2、E3催化泛素分子与底物蛋白赖氨酸侧链形成共价连接的级联反应过程, 该过程可以分为三步(图1a): ① 激活泛素分子: E1利用ATP水解释放的能量催化自身酶活中心的半胱氨酸的巯基与泛素分子C末端的甘氨酸残基的羧基结合形成高能硫酯键。② 转移泛素分子: E1将泛素分子转移至E2的半胱氨酸残基上, 形成E2-泛素复合物。③ 目标蛋白泛素化: E3识别特定的需要被泛素化的靶蛋白, 并催化泛素分子末端的羧基与靶蛋白赖氨酸侧链的氨基连接形成异肽键<sup>[2]</sup>。E3酶主要可分为RING、RBR和HECT三个亚家族。RING家族E3可以直接促进E2与泛素偶联的硫酯键与底物蛋白反应, 将泛素分子转移至底物, 而RBR和HECT家族E3首先将泛素从E2转移至自身酶活中心的半胱氨酸, 形成E3-泛素中间体, 再将泛素转移至底物蛋白上<sup>[5]</sup>。

泛素化修饰具有高度选择性主要取决于E3家族成员对底物识别的特异性<sup>[6]</sup>。连接在底物蛋白上的泛素链类型决定了底物蛋白的命运以及其参与的生命过程。决定形成何种泛素链的因素, 目前认为主要由E2或E2-E3复合物决定<sup>[7]</sup>。泛素分子自身具有7个赖氨酸及N端甲硫氨酸, 这些位点都可与另一泛素分子C末端的甘氨酸残基的羧基以异肽键进行连接, 从而形成K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63、M1连接的同型、杂合、分支等不同类型的多聚泛素链<sup>[8]</sup>(图1b)。这些不同类型的泛素链赋予底物蛋白不同的功能, 从而影响细胞的多种生命活动, 包括信号传递、胞吞作

用、DNA损伤与修复、细胞死亡、细胞免疫、细胞周期等(图1c)。

与其他蛋白质翻译后修饰类似, 泛素化也是一个可逆的动态过程。去泛素化酶(DUBs)能够移除底物蛋白上的泛素分子或泛素链, 从而实现底物的去泛素化修饰(图1a), 这增加了泛素化修饰在调控蛋白降解和功能活性方面的高度灵活性<sup>[9]</sup>。有趣的是, 研究发现还存在一些酶在泛素化系统中发挥着多重功能, 如锌指蛋白A20同时具有独特的E3连接酶结构域和DUB结构域, 既可以催化泛素化修饰, 也可以催化去泛素化修饰<sup>[10]</sup>。这种现象并非是催化混乱, 而是体现了泛素化调控的复杂性和精密性。

## 3 非经典泛素化修饰

随着泛素化研究的不断深入, 发现机体内还存在着有一部分不同于经典泛素化修饰特征的形式, 因此称其为非经典的泛素化修饰<sup>[11]</sup>。非经典泛素化修饰在多个方面与经典泛素化修饰存在显著差异, 主要体现在以下3个方面: ① 泛素与底物的连接方式: 经典泛素化修饰中, 泛素通常通过其C端甘氨酸与底物蛋白的赖氨酸侧链 $\epsilon$ -氨基形成酰胺键。相比之下, 非经典泛素化修饰则可以通过多种化学键连接泛素和底物。例如, 泛素可以与底物蛋白的半胱氨酸、丝氨酸或苏氨酸残基分别形成硫酯键或氧酯键。② 修饰底物的类型: 经典泛素化修饰以蛋白质底物为靶标, 而非经典泛素化修饰能够修饰非蛋白质分子如磷脂酰乙醇胺、脂质、多糖等。③ 泛素化修饰的过程: 经典泛素化修饰依赖于ATP和E1-E2-E3酶的级联反应, 而非经典泛素化修饰的过程可以不需要ATP激活泛素分子, 或者仅依赖单个酶即可完成整个泛素化过程。

### 3.1 通过酯键而非异肽键连接的泛素化

在泛素化修饰系统中, 以往研究报道的是泛素与底物的赖氨酸侧链 $\epsilon$ -氨基形成酰胺键(图2a)。但研究发现很多E3能催化泛素通过酯键与底物半胱氨酸、丝氨酸和苏氨酸残基连接<sup>[12]</sup>。氨基酸残基选择的多样性和灵活性可能实现更有效的泛素修饰, 特别是对缺乏赖氨酸残基的底物进行泛素化, 从而扩大了泛素修饰调控信号传导的复杂性和多样性。

半胱氨酸(Cys)残基在泛素化级联反应中起着重

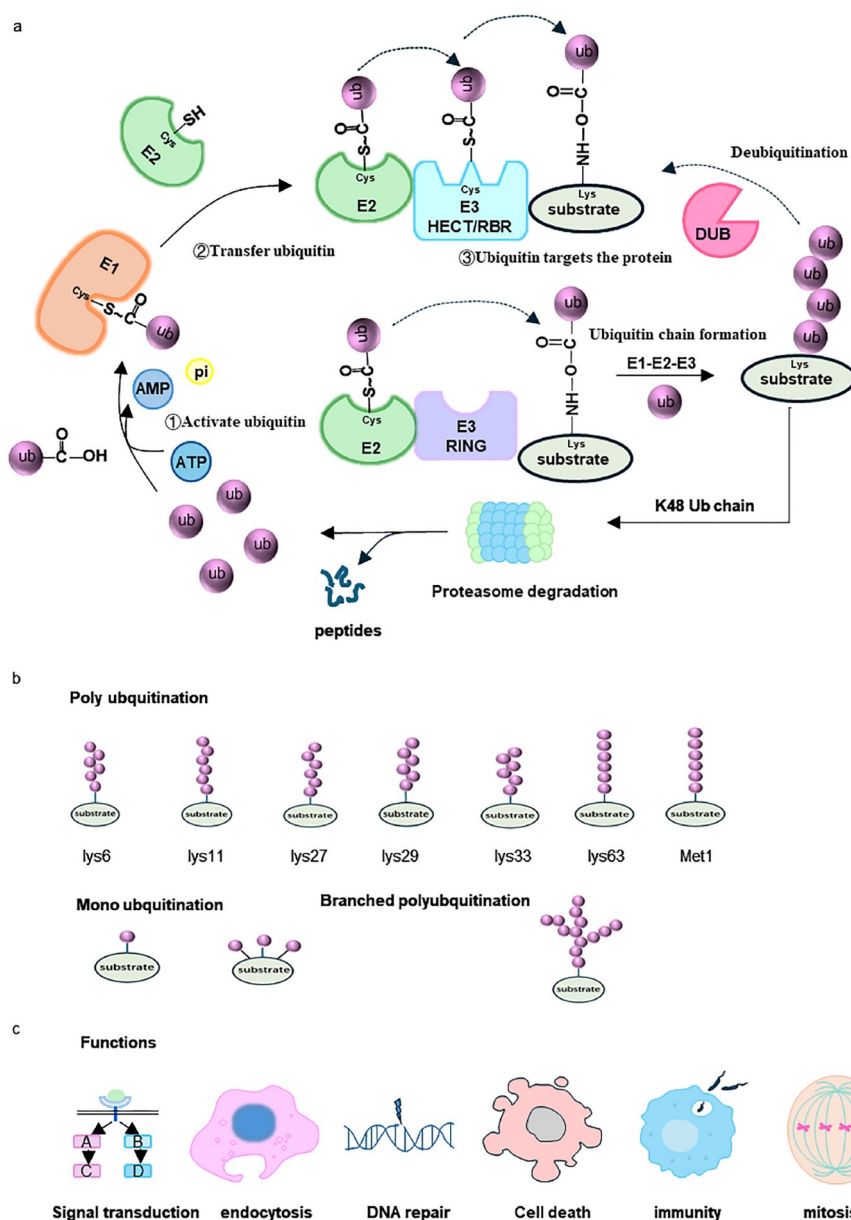
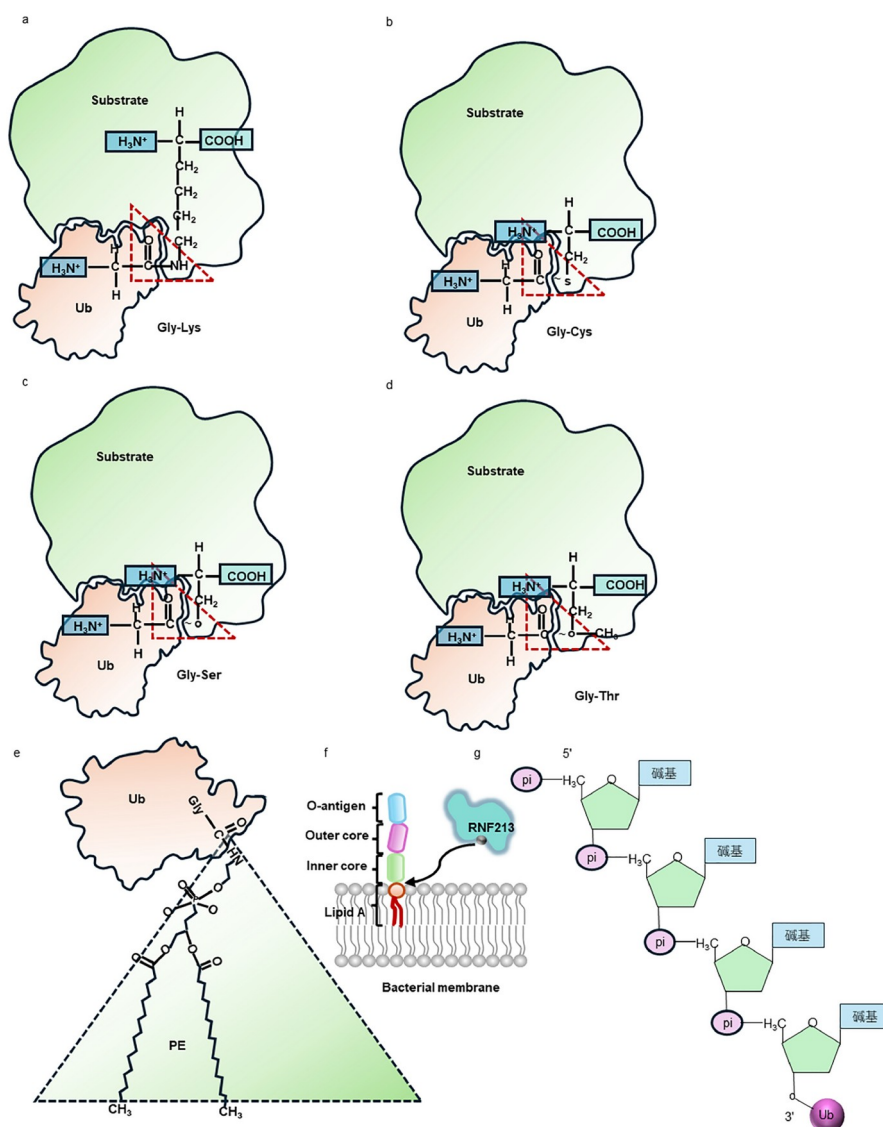


图 1 (网络版彩图) 泛素化机制与功能. (a) 经典泛素化修饰的过程; (b) 多聚泛素链的类型; (c) 泛素化修饰的功能

**Figure 1** (Color online) Mechanism and function of ubiquitination. (a) The process of classical ubiquitination modification; (b) the type of polyubiquitin chain; (c) the function of ubiquitination modification.

要的作用, E1、E2以及E3酶都是通过半胱氨酸以硫酯键与泛素结合<sup>[13]</sup>, 而研究发现蛋白质底物也能通过Cys通过硫酯键与泛素共价连接(图2b). 胞质中合成的大部分蛋白需要含有过氧化物酶体靶向序列(peroxisome targeting sequences, PTS)才能靶向运输至过氧化物酶体<sup>[14]</sup>. PTS受体识别PTS序列, 将蛋白运送到过氧化物酶体膜上的转运通道, 进而进入过氧化物酶体,

PTS受体再回到胞质中被循环使用<sup>[15,16]</sup>. Pex5p是1型过氧化物酶体靶向序列(PTS1)的受体, Pex5p需要被泛素化才能循环参与下一轮蛋白的运输<sup>[17]</sup>. 在酵母和哺乳动物中, E1、E2和E3酶介导Pex5p的N末端半胱氨酸残基Cys<sub>11</sub>通过硫酯键与泛素共价连接, 实现单泛素化修饰<sup>[18-20]</sup>. 研究发现这种以硫酯键连接的特殊的泛素化修饰能阻止Pex5p经典的多聚泛素化和降解, 同



**图 2** (网络版彩图)非经典泛素化修饰的连接方式. (a) 泛素分子C末端甘氨酸与赖氨酸以酰胺键连接. (b) 泛素分子C末端甘氨酸与底物的半胱氨酸以硫酯键连接. (c) 泛素分子C末端甘氨酸与底物的丝氨酸以氧酯键连接. (d) 泛素分子C末端甘氨酸与底物的苏氨酸以氧酯键连接. (e) 泛素分子C末端甘氨酸的羧基与磷脂酰乙醇胺头部的氨基以酰胺键连接. (f) RNF213催化泛素分子与LPS连接. (g) 泛素修饰单链核酸分子

**Figure 2** (Color online) Non-canonical ubiquitin linkage. (a) The C-terminal glycine of the ubiquitin is linked to lysine via an amide bond. (b) The C-terminal glycine of the ubiquitin is linked to the substrate's cysteine via a thioester bonds. (c) The C-terminal glycine of the ubiquitin is linked to the substrate's serine via an oxy-ester bond. (d) The C-terminal glycine of the ubiquitin is linked to the substrate's threonine via an oxy-ester bond. (e) The carboxyl group of the C-terminal glycine of the ubiquitin is linked to the amino group of the phosphatidylethanolamine head via an amide bond. (f) RNF213 catalyzed the linkage of ubiquitin to LPS. (g) Ubiquitin modification of single-strand nucleic acid molecules.

时由于硫酯键的不稳定性,使得Pex5p所形成的非经典泛素化修饰能被快速移除<sup>[21]</sup>,这将进一步的有利于Pex5p的回收利用<sup>[22]</sup>.此外,据报道,MIR1和MIR2是卡波西肉瘤相关疱疹病毒编码的两种E3泛素连接酶,能泛素化主要组织相容性复合体I(MHCI)分子以促进

其降解.其泛素化的具体机制是MIR1和MIR2能够催化泛素与MHCI半胱氨酸残基巯基进行连接形成硫酯键.

除半胱氨酸外,泛素还可以通过形成氧酯键连接到底物的丝氨酸(Ser)和苏氨酸(Thr)残基上(图2c, d).

由于Ser和Thr残基同时也是蛋白质磷酸化修饰的常见位点<sup>[23]</sup>, 这预示着在细胞内泛素化修饰和磷酸化修饰位点的重叠可能存在相互的串扰, 同时也为蛋白质功能调控提供了新的维度<sup>[24,25]</sup>. 有研究发现, 线性泛素链组装复合物(linear ubiquitin chain assembly complex, LUBAC)的组分HOIL-1是一种非典型的E3连接酶, 其能够催化泛素C端与底物蛋白中的Ser和Thr残基之间形成氧酯键<sup>[26-28]</sup>. 此外, 鼠类病毒E3连接酶K3(mK3)能够招募E2 Ube2j2对MHC1的羟基氨基酸Ser和Thr进行以氧酯键连接的泛素化修饰<sup>[29]</sup>, 进而引发MHC-1的降解<sup>[30]</sup>. BCL-2家族成员Bid (BH3 interacting domain death agonist)蛋白是一种促凋亡启动蛋白, 当接受凋亡刺激时, 其N末端结构需要被切割, 才能暴露出BH3结构域, 随后与其他凋亡相关蛋白互作而引发凋亡级联反应<sup>[31]</sup>. 研究发现, 在凋亡过程中, Bid被切割的N末端的Ser、Thr和Cys位点会发生非经典的泛素化修饰, 进而导致其被降解, 避免了其在细胞内的累积<sup>[32]</sup>.

### 3.2 不以蛋白为底物的泛素化

近年来, 关于非蛋白底物泛素化的发现显著拓展了当前对泛素化底物范围的认知. 这些发现涉及多种生物大分子, 包括脂质、糖类、核酸等. 研究发现, 在酵母和人体细胞的内吞体和液泡(或溶酶体)膜上的磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)分子能够发生泛素化修饰. 其具体机制是在泛素化相关酶Uba1(E1)、Ubc4/5(E2)和Tul1(E3)催化下泛素的C端甘氨酸残基与PE的氨基以酰胺键进行连接, 从而实现PE的泛素化修饰<sup>[33]</sup>(图2e). 泛素作为细胞内重要的标记工具, 能够为细胞对于外来物质的识别提供重要的指向性. 在细菌感染细胞的过程中, 宿主细胞能够利用泛素对外来物质进行标记, 其具体标记机制是宿主细胞内的E3泛素连接酶RNF213能对细菌脂多糖(LPS)的脂质A (LipidA)部分进行泛素化修饰, 其泛素化位点可能是LipidA的羟基、磷酸基团或两者皆有<sup>[34]</sup>(图2f). 另外, 研究发现HOIL-1不仅能够催化泛素化修饰蛋白质的非赖氨酸残基, 还能够泛素化修饰非蛋白质类的生物大分子. 在体外反应中, HOIL-1能够对糖原和以 $\alpha$ -1,4-糖苷键连接的麦芽七糖进行泛素化修饰, 其修饰位点为葡萄糖的C6羟基部分<sup>[35]</sup>. 核酸作为一类重要的生物大分子, 其能够发生与蛋白质类似的修饰, 如甲基

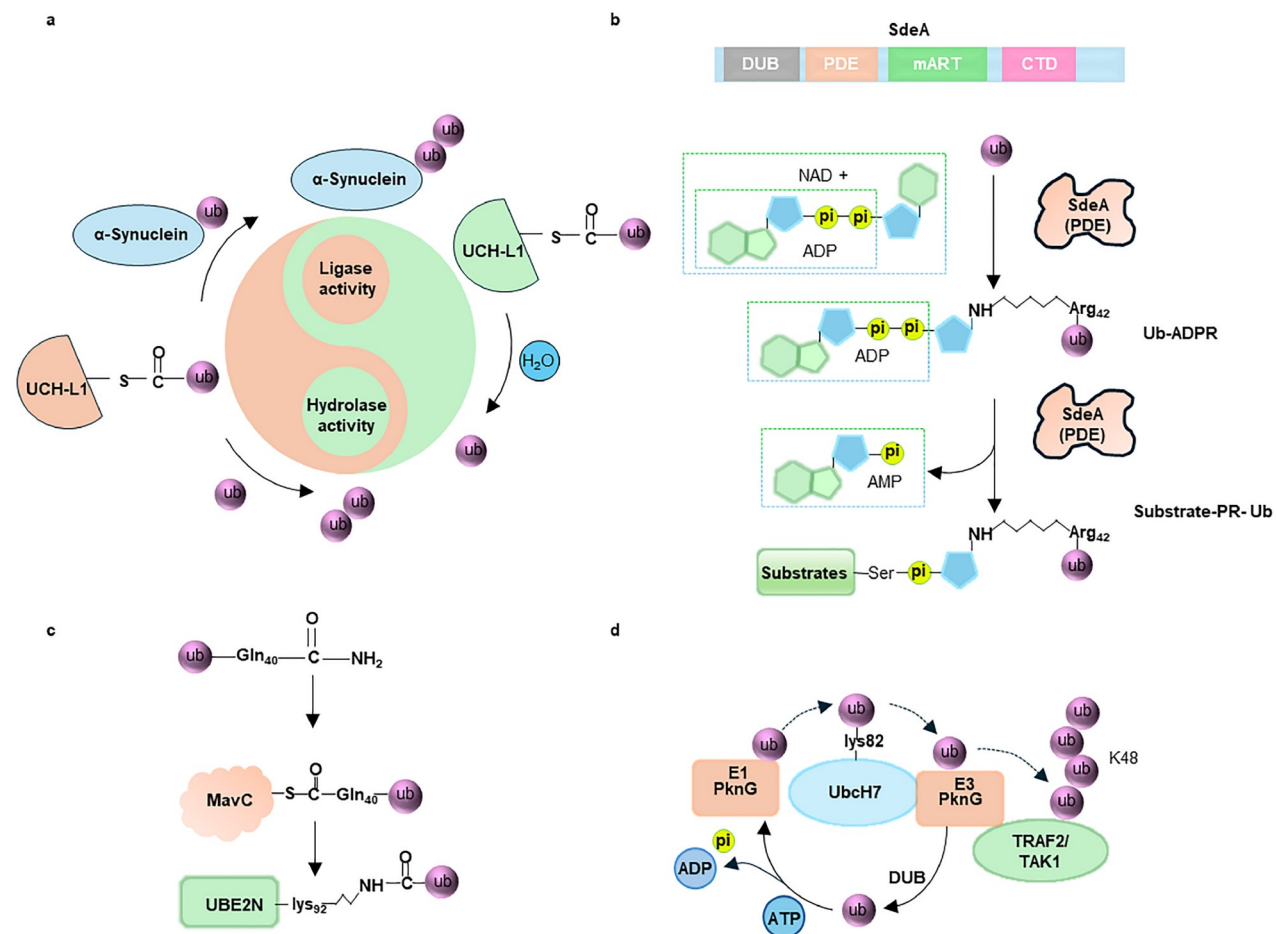
化、乙酰化、磷酸化等. 如同蛋白质的丝氨酸和苏氨酸, 核酸分子也具有活跃的羟基, 并且已有研究表明ADPR和NAD的羟基能够与泛素进行连接<sup>[36,37]</sup>, 这似乎预示着核酸具有发生泛素化修饰的可能性. 最新研究表明, 在体外DELTEX家族E3酶能够催化单链核酸分子3'端的腺嘌呤核苷酸的核糖3'-OH与泛素连接, 并且这种修饰能够有效避免3'→5'核酸酶的降解<sup>[38]</sup>(图2g). 然而, 核酸分子是否在体内也能被泛素化修饰以及其在细胞中的生物学功能仍有待进一步研究.

### 3.3 新型泛素化途径

近年来, 已经有研究表明E1-E2-E3的级联反应和ATP并不是泛素化途径的必要条件. 这些发现挑战了对经典泛素化修饰过程的认知, 也为泛素化理论的新定义提供了重要依据.

泛素羧基末端水解酶L1 (UCHL1)属于UCH蛋白酶家族, 在脑中大量表达, 参与了细胞凋亡、学习和记忆的调控, UCHL1突变导致的功能缺失与多种疾病相关, 包括神经退行性疾病、癌症和纤维化<sup>[39]</sup>. 研究发现, 虽然UCHL1是一种去泛素化酶, 但在体外能对单泛素化和双泛素化的 $\alpha$ -突触核蛋白进行泛素链的延长, 形成多聚泛素链. 在这一过程中, UCHL1无需ATP激活泛素, 而是利用自身的巯基蛋白酶活性直接获得泛素, 并进一步转移到底物上来实现对底物蛋白的多聚泛素化修饰<sup>[40]</sup>(图3a).

2016年, 有研究发现嗜肺军团菌效应蛋白质SidE家族能够催化一种不依赖于E1和E2酶的新型泛素化途径<sup>[41]</sup>. 这一发现颠覆了传统认知, 展示了一种不依赖于E1和E2酶的泛素化机制. 有别于已知的细菌E3连接酶, SidE家族成员SdeA能够直接催化泛素转移, 无需借助宿主的E1和E2酶. 在结构上SdeA蛋白具有两个催化非经典泛素化的关键功能域: ADP核糖转移酶结构域(mART结构域)和磷酸二酯酶结构域(PDE结构域)(图3b). 泛素化过程分为两个主要步骤(图3b): 首先, mART结构域催化NAD<sup>+</sup>中的ADP核糖基团转移到Ub的第42位精氨酸(Arg<sub>42</sub>)上, 形成单ADP核糖基化的泛素(ADPR-Ub). 随后, PDE结构域催化ADPR-Ub与底物蛋白的丝氨酸残基结合, 形成丝氨酸-泛素修饰产物, 同时释放AMP. 值得注意的是, 在缺乏底物蛋白的情况下, ADPR-Ub可以水解生成磷酸核糖基化的泛素(PR-Ub)<sup>[42]</sup>. 紧随其后, 研究又发现了另一种非典型的



**图 3** (网络版彩图) 新型泛素化途径. (a) UCHL1 同时具有连接酶和水解酶活性. (b) SdeA 以非经典的两步反应催化磷酸核糖泛素修饰蛋白底物的 Ser 上. (c) MavC 以转谷氨酰胺酶活性催化泛素的 Gln 残基与底物蛋白 Lys 残基相连. (d) PknG 具有三重酶活性. **Figure 3** (Color online) Novel ubiquitination pathways. (a) UCHL1 possesses both ligase and hydrolase activities. (b) SdeA catalyzes the phosphoribosyl ubiquitin modification on the Ser residue of protein substrates through a non-canonical two-step reaction. (c) MavC catalyzes the linkage between the Gln residue of ubiquitin and the Lys residue of the substrate protein through its transglutaminase activity. (d) PknG exhibits triple enzymatic activities.

泛素化机制. 嗜肺军团菌的效应蛋白 MavC 作为转谷氨酰胺酶通过转谷氨酰胺反应催化底物蛋白的泛素化修饰, 而不需要泛素化酶和 ATP<sup>[43]</sup>. 其催化的机制是 MavC 的第 74 位半胱氨酸 (Cys<sub>74</sub>) 首先攻击泛素的 Gln<sub>40</sub>, 形成硫酯中间体. 随后, 这个中间体与底物 UBE2N (一种 E2 酶) 的第 92 位或 94 位赖氨酸 (Lys<sub>92</sub> 或 Lys<sub>94</sub>) 侧链的 ε-氨基反应, 形成分子间酰胺键<sup>[44]</sup> (图 3c).

结核分枝杆菌的效应蛋白丝/苏氨酸蛋白激酶 (protein kinase G, PknG) 被报道是一种全新的泛素修饰酶, 能催化宿主底物的泛素化修饰并促进其通过蛋白酶体降解. 这种非经典的两步级联反应过程如下 (图 3d): ① 依赖于 ATP 水解为 ADP 而非 ATP 水解为

AMP 提供能量, PknG 作为 E1 通过新型泛素样 (Ubl) 结构域结合 Ub, 再转移 Ub 至宿主 E2 Ubch7 的 Lys<sub>82</sub> 残基上. ② PknG 又作为 DUB, 水解泛素-Ubch7 并释放 Ub, 再作为 E3 催化 Ub 转移至其底物肿瘤坏死因子受体相关因子 2 (TRAF2) 和 TGF-β 活化激酶 1 (TAK1). 综上, PknG 展现出 E1、DUB、E3 三重活性, 能够靶向宿主固有免疫系统的关键蛋白 (TRAF2 和 TAK1), 从而干扰宿主固有免疫信号通路<sup>[45]</sup>.

#### 4 非经典泛素化修饰的功能

泛素化修饰作为一种重要的翻译后修饰, 其修饰

底物的广泛性决定了泛素化修饰能够参与并影响细胞的各项生命活动<sup>[46,47]</sup>。因此泛素化系统的稳态对于细胞各项生命活动的正常进行至关重要。非经典的泛素化修饰作为一类特殊形式的泛素化修饰,其在免疫调节,细胞内蛋白质的质量控制以及神经系统的生长发育方面也同样发挥着重要作用。

#### 4.1 宿主免疫防御

泛素系统在宿主细胞抵御细菌感染过程中扮演着关键角色,广泛参与先天免疫和炎症信号的激活。多种宿主细胞E3泛素连接酶能够对入侵病原体表面蛋白进行泛素化,这种修饰作为一种响应信号,能够诱发宿主自噬并清除病原体<sup>[48-50]</sup>。然而,近期研究表明,宿主在防御病原菌感染的过程中还采用了一些非经典的泛素化策略。Otten团队<sup>[34]</sup>研究发现在沙门氏菌(*S. Typhimurium*)感染期间,泛素化靶标还包括非蛋白底物。他们发现宿主细胞E3泛素连接酶(ring finger protein213, RNF213)能够以脂多糖(LPS)的脂质A部分为底物进行泛素化修饰。这种非典型的泛素化作为一种抗菌和促炎信号,启动了LUBAC(线性泛素链组装复合物)介导的免疫信号传导,从而有效对抗侵入细胞质的鼠伤寒沙门氏菌。研究进一步表明,RNF213介导的LPS泛素化对宿主细胞的免疫应答至关重要。在RNF213介导LPS泛素化缺失的情况下,感染鼠伤寒沙门氏菌后4 h,宿主细胞出现了多方面的免疫功能障碍:①无法有效招募关键免疫分子,包括LUBAC、NF- $\kappa$ B效应分子(NEMO)、泛素结合自噬受体蛋白Optineurin和LC3等;②自噬受体p62和NDP52的易位受阻。这些障碍严重阻碍了宿主细胞的自噬响应,导致细菌能够在宿主细胞内存活和增殖<sup>[51]</sup>。

#### 4.2 病原体逃逸

在病原菌感染宿主过程中,病原菌利用多种蛋白分泌系统将效应因子输送到宿主细胞内,从而操纵宿主的物质运输、代谢合成、基因表达与翻译等多种生理过程<sup>[52,53]</sup>。研究发现,嗜肺军团菌效应因子SidE家族成员SdeA对宿主细胞内的多种内质网相关蛋白进行非经典泛素化修饰<sup>[42]</sup>,这些蛋白包括参与维持细胞骨架系统、内质网的发生和囊泡运输的GTPases、RTN3、RTN4、TEX264、FAM134A、FAM134B和FAM134C<sup>[54-57]</sup>,改变其功能活性,导致宿主细胞内骨

架系统受损,内质网膜发生碎片化<sup>[58]</sup>,而SidE家族缺失的突变菌株对宿主的毒力减弱<sup>[59]</sup>。由于这种修饰导致这些蛋白的功能活性丧失,进而对宿主细胞产生毒性。为了保障病原菌能够在宿主细胞的持续性的增殖,病原菌能够利用其独特平衡机制,实现持续抑制免疫反应而不导致宿主细胞死亡<sup>[60]</sup>。在嗜肺军团菌感染的早期,效应因子SdeA通过非经典的泛素化修饰影响宿主的多条信号通路,以构建其在宿主内的最适生长环境。然而,为避免感染对宿主造成的长期毒性作用而导致细胞的死亡,军团菌在感染后期利用其独特的平衡机制来移除这种泛素化修饰,从而保障宿主细胞的存活。其具体机制是嗜肺军团菌分泌的另一个效应蛋白SidJ可以抑制这种非经典泛素化反应。SidJ是一种依赖于宿主细胞钙调蛋白(Calmodulin, CaM)的谷氨酸修饰酶,能修饰SdeA其mART结构域的谷氨酸残基,导致mART结构域酶活性失活,抑制ADP核糖泛素的形成<sup>[61]</sup>。此外,嗜肺军团菌效应蛋白DupA和DupB可充当磷酸核糖泛素化的特异性去泛素化酶,调节宿主靶标的磷酸核糖泛素化水平<sup>[62]</sup>。

上述非经典泛素化所产生的ADPR-Ub和PR-Ub副产物往往会扰乱宿主细胞的正常的泛素系统,极大地影响宿主细胞的存活<sup>[42]</sup>。因此,军团菌为避免因宿主细胞的死亡而对自身的生长所产生不利影响,军团菌通过分泌一种新型的磷酸化AMP酶(phosphoryl-AM-Pylase) LnaB并以肌动蛋白依赖的方式将SidE、DupA/B水解产生的PR-Ub转化为ADPR-Ub。ADPR-Ub在ADP-核糖基水解酶(ADP-ribosyl hydrolase, ARH) MavL作用下水解形成游离的Ub,从而实现Ub的回收利用。这一复杂的机制有效解决了非经典泛素化修饰所产生的ADPR-Ub和PR-Ub在宿主细胞内的累积问题,避免了它们对宿主细胞正常泛素系统的扰乱,有利于宿主细胞的存活,对于军团菌的存活和增殖具有重要作用<sup>[63,64]</sup>。

结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*, Mtb)作为一种胞内寄生病原菌,同样采用多种策略干预宿主细胞的囊泡转运、细胞死亡和自噬过程,以逃避宿主先天免疫并实现其感染、存活、致病和传播<sup>[65]</sup>。效应蛋白PknG通过非经典的两步级联反应催化宿主底物的泛素化修饰,最终抑制宿主NF- $\kappa$ B固有免疫信号通路的激活,从而躲避宿主的免疫监视并促进Mtb的胞内存活<sup>[45]</sup>。

### 4.3 内质网相关降解

哺乳动物中对内质网新生蛋白质的折叠和组装的监测过程被称为“内质网质量控制”<sup>[66]</sup>。通过质量检查的蛋白质可以离开内质网,进而被分选和转运到其他细胞器中、细胞外或细胞膜。然而,在内质网中未能正常成熟或出现功能失调的蛋白质会被转送到胞质溶胶,并由26S蛋白酶体降解,这一过程被称为内质网相关降解(ER-associated protein degradation, ERAD)<sup>[67]</sup>。因此ERAD是细胞内对蛋白质质量控制的重要途径。小鼠 $\gamma$ 疱疹病毒蛋白mK3是一种病毒RING-CH型E3连接酶,特异性识别并对主要组织相容性复合物I重链(MHC-I)丝氨酸、苏氨酸或赖氨酸残基进行非经典泛素化修饰,引发ERAD<sup>[30]</sup>。此外,E3泛素连接酶Hrd1p是一种ER的膜蛋白,是许多底物的ER相关降解所必需的,其能催化ERAD底物NS-1 $\kappa$ LC丝氨酸、苏氨酸和赖氨酸残基的多聚泛素化修饰,进而控制蛋白NS-1 $\kappa$ LC的周转<sup>[68]</sup>,但其功能尚未完全研究清楚。

### 4.4 调控自噬发生

自噬是细胞降解和循环利用自身物质的过程<sup>[69]</sup>。研究发现,泛素偶联的磷脂酰乙醇胺位于液泡(vacuole)和内吞体/多泡小体(multivesicular body)上,其作为一种特殊的修饰信号,招募细胞内负责囊泡运输的内体分选转运复合体(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)的组成成员,如Vps23、Hse1和Vps27等,最终导致膜内陷从而促进囊泡的形成,并最终运送至溶酶体降解。营养应激和代谢合成受到抑制往往会诱导自噬的发生。在营养应激下磷脂酰乙醇胺上的泛素化修饰会进一步加强,这预示着磷脂酰乙醇胺上的泛素化修饰可能与细胞自噬的发生相关<sup>[33]</sup>。

### 4.5 调节神经系统发育

华勒氏变性(Wallerian degeneration)是轴突损伤后的程序性变性,主要发生在中枢和周围神经系统中<sup>[70]</sup>。Myc结合蛋白2(Myc-binding protein 2, MYCBP2)是一种RING家族E3,在神经退行性疾病中发挥促神经退行性的作用<sup>[71]</sup>。MYCBP2能够泛素化烟酰胺单核苷酸腺苷酸转移酶(nicotinamide mononucleotide adenylyl-transferase 2, NMNAT2),进而影响代谢过程中辅酶

NAD的形成,参与神经系统的轴突发育和保护<sup>[72]</sup>。与传统RING家族的所形成E3酶复合物有所不同,MYCBP2组装成非经典的SCF泛素连接酶复合体,不需要Cullin起支架作用,而是通过其N末端FBD1区域与衔接蛋白Fbxo45和Skp1结合<sup>[73]</sup>,并且MYCBP2以两个半胱氨酸的转硫醇作用相继转移泛素分子至底物NMNAT2的苏氨酸羟基上,从而破坏NMNAT2的稳定性,促进Wallerian degeneration<sup>[74-76]</sup>。研究表明,敲除Skp1或Fbxo45均会引起MYCBP2功能沉默,使得NMNAT2稳定,进而给予轴突保护并增强其响应神经损伤应激的能力<sup>[77]</sup>。

## 5 总结与展望

近年来发现的非经典泛素化修饰方式,在修饰位点、化学键种类、底物类型、催化途径等方面都与经典的泛素化修饰有所不同,这催生了泛素化研究领域的新方向。然而,要发现更多非经典泛素化修饰并解析其对生命活动的调控作用仍然面临诸多挑战。非经典泛素化和经典的泛素化均涉及利用泛素分子对底物进行共价修饰。这意味着非经典泛素化修饰与经典的泛素化修饰在细胞内可能以一种混杂的形式存在,因此有效区分和解析非经典泛素化修饰需要更为复杂和精细的研究策略。在技术上,目前,对于翻译后修饰位点的精确鉴定主要依赖于质谱技术,而非经典泛素化修饰相较于传统的泛素化修饰丰度往往较低,这对于质谱的灵敏度和精确性提出了更高的要求。在机制上,传统的泛素化修饰通常通过异肽键将泛素与底物进行连接,对于以非异肽键连接的非经典泛素化修饰的解析则需要更深入地探索参与反应的位点和形成的化学键。在实验设计上,传统的泛素化遵循酶促级联反应过程,而非经典泛素化的催化途径表现出高度多样性,且中间过程往往具有瞬时性而不易被捕获,在实验过程中较难发现。这些都使得对非经典泛素化的催化途径和机制的解析具有极大的挑战,未来的研究如果能够有效地解决这些挑战:提高质谱的灵敏度,开发特异性的抗体提高富集效率,运用人工智能预测反应机理,增加蛋白的结构解析等,都将对非经典泛素化的研究带来巨大突破。推动非经典泛素化领域的发展需要多学科交叉,为解析和利用非经典泛素化修饰提供更多的理论依据。

当前在病菌入侵宿主的过程中发现了众多的非经典泛素化的途径, 如效应因子SdeA、MavC、PknG等所催化泛素化修饰的非经典途径, 那是否在真核生物内也存在类似的生理过程? 目前还没有研究报道在真核细胞内存在类似的酶不依赖于ATP、三酶级联反应或转硫醇作用而催化泛素修饰底物的非经典途径. 但有研究将泛素C末端的两个甘氨酸突变的突变体导入到真核细胞中, 发现细胞依旧能够利用该泛素突变体对蛋白质进行泛素化修饰, 这预示着真核细胞内可能存在一类有别于传统的泛素级联反应过程和以赖氨酸-甘氨酸连接形式的泛素化形式<sup>[78]</sup>. 然而, 真核细胞内调控网络极其复杂, 又由于以非经典途径进行的泛素化修饰相较于传统的泛素化修饰, 其所占的比例相对较低且不易与传统的泛素化修饰进行区分, 要发现真核细胞内以催化泛素化修饰的非经典途径和机制目前仍具有很大难度. 因此, 在真核细胞内发现并解析这些区别于传统泛素化的修饰以及明确其修饰的底物将是未来研究的重点. 此外, 泛素化修饰已经被发现能够修饰蛋白质、脂质和核酸等众多的生物大分子. 对于泛素化修饰是否能够修饰更多类型生物分子, 以及明

确其修饰功能以及生理意义将是未来非经典泛素化研究的重要方向.

泛素化修饰紊乱在神经退行性疾病和肿瘤等多种人类疾病中发挥着重要的作用, 非经典泛素化作为一类特殊的泛素化修饰形式, 明确其是否在人类疾病中也发挥着重要的作用, 并解析其在疾病发生发展过程中的作用机制, 这或许将为疾病的预防和治疗提供全新潜在的治疗靶点和策略. 此外, 基于传统的泛素系统理论所衍生的蛋白降解靶向嵌合体技术和分子胶等技术, 在疾病治疗中已经展现出巨大应用潜力和 market 价值. 因此将这些技术与非经典泛素化进行结合或许能够更进一步拓宽这些技术的应用, 为疾病的治疗提供更多选择.

非经典泛素化研究正在改写我们对泛素化系统的理解并提出新概念, 为泛素化领域开辟了新的研究方向. 这些研究不仅揭示了泛素化机制的复杂性, 也证实了泛素系统调控的广泛性. 深入研究非经典泛素化在生理过程和疾病中的调控作用, 并开发针对非经典泛素化过程的干预药物, 将为相关疾病的研究和治疗带来新的希望.

## 参考文献

- 1 Zheng N, Shabek N. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86: 129–157
- 2 Pickart CM. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 503–533
- 3 French ME, Koehler CF, Hunter T. *Cell Discov*, 2021, 7: 6
- 4 Hershko A, Ciechanover A. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 425–479
- 5 Berndsen CE, Wolberger C. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21: 301–307
- 6 Morreale FE, Walden H. *Cell*, 2016, 165: 248–248.e1
- 7 Ye Y, Rape M. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 755–764
- 8 Akutsu M, Dikic I, Bremm A. *J Cell Sci*, 2016, 129: 875–880
- 9 Komander D, Clague MJ, Urbé S. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 550–563
- 10 Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, Wu P, Wiesmann C, Baker R, Boone DL, Ma A, Koonin EV, Dixit VM. *Nature*, 2004, 430: 694–699
- 11 Dikic I, Schulman BA. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24: 273–287
- 12 Ferri-Blazquez A, Jarosch E, Sommer T. *Methods Mol Biol (Clifton, NJ)*, 2023, 2602: 3–18
- 13 Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM. *Nature*, 1995, 373: 81–83
- 14 Girzalsky W, Platta HW, Erdmann R. *Biol Chem*, 2009, 390: 745–751
- 15 Skowyra ML, Feng P, Rapoport TA. *Trends Cell Biol*, 2024, 34: 388–405
- 16 Francisco T, Rodrigues TA, Pinto MP, Carvalho AF, Azevedo JE, Grou CP. *Biochimie*, 2014, 98: 29–35
- 17 Platta HW, Magraoui FE, Schlee D, Grunau S, Girzalsky W, Erdmann R. *J Cell Biol*, 2007, 177: 197–204
- 18 Williams C, van den Berg M, Sprenger RR, Distel B. *J Biol Chem*, 2007, 282: 22534–22543
- 19 Grou CP, Carvalho AF, Pinto MP, Wiese S, Piechura H, Meyer HE, Warscheid B, Sá-Miranda C, Azevedo JE. *J Biol Chem*, 2008, 283: 14190–

14197

- 20 El Magraoui F, Bäumer BE, Platta HW, Baumann JS, Girzalsky W, Erdmann R. *FEBS J*, 2012, 279: 2060–2070
- 21 Schwartzkopff B, Platta HW, Hasan S, Girzalsky W, Erdmann R. *Biosci Rep*, 2015, 35: e00215
- 22 Okumoto K, Misono S, Miyata N, Matsumoto Y, Mukai S, Fujiki Y. *Traffic*, 2011, 12: 1067–1083
- 23 Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M. *Cell*, 2006, 127: 635–648
- 24 Filipčík P, Curry JR, Mace PD. *J Mol Biol*, 2017, 429: 1097–1113
- 25 Barbour H, Nkwe NS, Estavoyer B, Messmer C, Gushul-Leclaire M, Villot R, Uriarte M, Boulay K, Hlayhel S, Farhat B, Milot E, Mallette FA, Daou S, Affar EB. *iScience*, 2023, 26: 106276
- 26 Kelsall IR, Zhang J, Knebel A, Arthur JSC, Cohen P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 13293–13298
- 27 Cohen P, Kelsall IR, Nanda SK, Zhang J. *Adv Biol Regulat*, 2020, 75: 100666
- 28 McCrory EH, Akimov V, Cohen P, Blagoev B. *Biochem J*, 2022, 479: 2419–2431
- 29 Wang X, Herr RA, Rabelink M, Hoeven RC, Wiertz EJHJ, Hansen TH. *J Cell Biol*, 2009, 187: 655–668
- 30 Wang X, Herr RA, Chua WJ, Lybarger L, Wiertz EJHJ, Hansen TH. *J Cell Biol*, 2007, 177: 613–624
- 31 Esposti MD. *Apoptosis*, 2002, 7: 433–440
- 32 Tait SWG, de Vries E, Maas C, Keller AM, D’Santos CS, Borst J. *J Cell Biol*, 2007, 179: 1453–1466
- 33 Sakamaki J, Ode KL, Kurikawa Y, Ueda HR, Yamamoto H, Mizushima N. *Mol Cell*, 2022, 82: 3677–3692.e11
- 34 Otten EG, Werner E, Crespillo-Casado A, Boyle KB, Dharamdasani V, Pathe C, Santhanam B, Randow F. *Nature*, 2021, 594: 111–116
- 35 Kelsall IR, McCrory EH, Xu Y, Scudamore CL, Nanda SK, Mancebo-Gamella P, Wood NT, Knebel A, Matthews SJ, Cohen P. *EMBO J*, 2022, 41: e109700
- 36 Zhu K, Suskiewicz MJ, Chatrin C, Strömberg Ø, Dorsey BW, Aucagne V, Ahel D, Ahel I. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52: 801–815
- 37 Zhu K, Suskiewicz MJ, Hloušek-Kasun A, Meudal H, Mikoč A, Aucagne V, Ahel D, Ahel I. *Sci Adv*, 2022, 8: eadd4253
- 38 Zhu K, Chatrin C, Suskiewicz MJ, Aucagne V, Foster B, Kessler BM, Gibbs-Seymour I, Ahel D, Ahel I. *EMBO Rep*, 2024, 25: 4172–4189
- 39 Yasuda T, Nihira T, Ren Y, Cao X, Wada K, Setsue R, Kabuta T, Wada K, Hattori N, Mizuno Y, Mochizuki H. *J Neurochem*, 2009, 108: 932–944
- 40 Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury Jr. PT. *Cell*, 2002, 111: 209–218
- 41 Qiu J, Sheedlo MJ, Yu K, Tan Y, Nakayasu ES, Das C, Liu X, Luo ZQ. *Nature*, 2016, 533: 120–124
- 42 Bhogaraju S, Kalayil S, Liu Y, Bonn F, Colby T, Matic I, Dikic I. *Cell*, 2016, 167: 1636–1649.e13
- 43 Valteau D, Quail AT, Cui H, Xu X, Evdokimova E, Chang C, Cuff ME, Urbanus ML, Houliston S, Arrowsmith CH, Ensminger AW, Savchenko A. *Cell Rep*, 2018, 23: 568–583
- 44 Guan H, Fu J, Yu T, Wang Z, Gan N, Huang Y, Perčulija V, Li Y, Luo Z, Ouyang S. *Adv Sci*, 2020, 7: 2000871
- 45 Wang J, Ge P, Lei Z, Lu Z, Qiang L, Chai Q, Zhang Y, Zhao D, Li B, Su J, Peng R, Pang Y, Shi Y, Zhang Y, Gao GF, Qiu X, Liu CH. *EMBO Rep*, 2021, 22: e52175
- 46 Popovic D, Vucic D, Dikic I. *Nat Med*, 2014, 20: 1242–1253
- 47 Cockram PE, Kist M, Prakash S, Chen SH, Wertz IE, Vucic D. *Cell Death Differ*, 2021, 28: 591–605
- 48 Franco LH, Nair VR, Scharn CR, Xavier RJ, Torrealba JR, Shiloh MU, Levine B. *Cell Host Microbe*, 2017, 21: 59–72
- 49 Huett A, Heath RJ, Begun J, Sassi SO, Baxt LA, Vyas JM, Goldberg MB, Xavier RJ. *Cell Host Microbe*, 2012, 12: 778–790
- 50 Manzanillo PS, Ayres JS, Watson RO, Collins AC, Souza G, Rae CS, Schneider DS, Nakamura K, Shiloh MU, Cox JS. *Nature*, 2013, 501: 512–516
- 51 Gong Y, Nie L, Dai L. *MedComm*, 2021, 2: 855–857
- 52 Hubber A, Roy CR. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2010, 26: 261–283
- 53 Finsel I, Hilbi H. *Cell Microbiol*, 2015, 17: 935–950
- 54 Steiner B, Swart AL, Welin A, Weber S, Personnic N, Kaech A, Freyre C, Ziegler U, Klemm RW, Hilbi H. *EMBO Rep*, 2017, 18: 1817–1836
- 55 Machner MP, Isberg RR. *Dev Cell*, 2006, 11: 47–56
- 56 Grond R, Veenendaal T, Duran JM, &Raote I, van Es JH, Corstjens S, Delfgou L, El Haddouti B, Malhotra V, Rabouille C. *J Cell Biol*, 2020, 219: e202004191
- 57 Grumati P, Morozzi G, Hölper S, Mari M, Harwardt MLI, Yan R, Müller S, Reggiori F, Heilemann M, Dikic I. *eLife*, 2017, 6: e25555

- 58 Liu Y, Mukherjee R, Bonn F, Colby T, Matic I, Glogger M, Heilemann M, Dikic I. *Cell Death Differ*, 2021, 28: 2957–2969
- 59 Xie Y, Zhang Y, Wang Y, Feng Y. *Pathogens*, 2023, 12: 629
- 60 Havey JC, Roy CR, Bäumlér AJ. *Infect Immun*, 2015, 83: 3506–3514
- 61 Qiu J, Yu K, Fei X, Liu Y, Nakayasu ES, Piehowski PD, Shaw JB, Puvar K, Das C, Liu X, Luo ZQ. *Cell Res*, 2017, 27: 865–881
- 62 Khaminets A, Heinrich T, Mari M, Grumati P, Huebner AK, Akutsu M, Liebmann L, Stolz A, Nietzsche S, Koch N, Mauthe M, Katona I, Qualmann B, Weis J, Reggiori F, Kurth I, Hübner CA, Dikic I. *Nature*, 2015, 522: 354–358
- 63 Fu J, Li S, Guan H, Li C, Zhao YB, Chen TT, Xian W, Zhang Z, Liu Y, Guan Q, Wang J, Lu Q, Kang L, Zheng SR, Li J, Cao S, Das C, Liu X, Song L, Ouyang S, Luo ZQ. *Nat Commun*, 2024, 15: 5953
- 64 Wang T, Song X, Tan J, Xian W, Zhou X, Yu M, Wang X, Xu Y, Wu T, Yuan K, Ran Y, Yang B, Fan G, Liu X, Zhou Y, Zhu Y. *Nature*, 2024, 631: 393–401
- 65 Liu CH, Liu H, Ge B. *Cell Mol Immunol*, 2017, 14: 963–975
- 66 Hwang J, Qi L. *Trends Biochem Sci*, 2018, 43: 593–605
- 67 Vembar SS, Brodsky JL. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9: 944–957
- 68 Shimizu Y, Okuda-Shimizu Y, Hendershot LM. *Mol Cell*, 2010, 40: 917–926
- 69 Mizushima N. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 521–527
- 70 Coleman MP, Höke A. *Nat Rev Neurosci*, 2020, 21: 183–196
- 71 Lewcock JW, Genoud N, Lettieri K, Pfaff SL. *Neuron*, 2007, 56: 604–620
- 72 Brazill JM, Li C, Zhu Y, Zhai RG. *Curr Opin Genet Dev*, 2017, 44: 156–162
- 73 Desbois M, Crawley O, Evans PR, Baker ST, Masuho I, Yasuda R, Grill B. *J Biol Chem*, 2018, 293: 13897–13909
- 74 Pao KC, Wood NT, Knebel A, Rafie K, Stanley M, Mabbitt PD, Sundaramoorthy R, Hofmann K, van Aalten DMF, Virdee S. *Nature*, 2018, 556: 381–385
- 75 Mabbitt PD, Loreto A, Déry MA, Fletcher AJ, Stanley M, Pao KC, Wood NT, Coleman MP, Virdee S. *Nat Chem Biol*, 2020, 16: 1227–1236
- 76 Virdee S. *Neural Regen Res*, 2022, 17: 2347–2350
- 77 Yamagishi Y, Tessier-Lavigne M. *Cell Rep*, 2016, 17: 774–782
- 78 Gan N, Nakayasu ES, Hollenbeck PJ, Luo ZQ. *Nat Microbiol*, 2019, 4: 134–143

## The mechanism and biological function of non-canonical ubiquitination

Wenjing Chen<sup>1</sup>, Jing Dai<sup>1</sup>, Ming Yan<sup>1</sup>, Mao Ye<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> School of Biology, Hunan University, Changsha 410082, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Chemo-Biosensing and Metrology, Changsha 410082, China

\*Corresponding author (email: [goldleaf@hnu.edu.cn](mailto:goldleaf@hnu.edu.cn))

**Abstract:** Ubiquitination is an energy-dependent post-translational modification that specifically modifies substrates. Due to its ability to modify numerous substrate proteins, it plays a crucial role in various cellular activities. With the deepening of research on canonical ubiquitination, non-canonical ubiquitination modifications have gradually been discovered and have attracted widespread attention. Non-canonical ubiquitination is a novel form of ubiquitin modification that differs from canonical ubiquitination in several aspects, including the types of amino acid residues of the substrate involved in the modification process, the linkage manner between ubiquitin and substrates, the types of substrates, and the enzymatic reaction processes. Non-canonical ubiquitination modifications can participate in regulating a multitude of biological activities such as host-pathogen interactions, autophagy, endoplasmic reticulum-associated degradation, and neuronal functions. This review summarizes the latest advancements in non-canonical ubiquitination research, discusses its mechanisms of action and biological functions within cells, and provides new perspectives for further understanding the complexity of ubiquitination modifications and their significance in life processes.

**Keywords:** ubiquitination, non-canonical, post-translational modification, mechanism, function

**doi:** [10.1360/SSC-2024-0231](https://doi.org/10.1360/SSC-2024-0231)