



含有多种酶活性的 SIRT5 蛋白在细胞代谢中的功能

杨鑫^①, 刘博雅^①, 朱卫国^②, 罗建沅^{①③*}

① 北京大学医学部基础医学院医学遗传学系, 北京 100191;

② 北京大学医学部基础医学院生物化学与分子生物学系, 北京 100191;

③ Department of Medical & Research Technology, School of Medicine, University of Maryland, Baltimore 21201, USA

* 联系人, E-mail: jluo@som.umaryland.edu

收稿日期: 2015-04-06; 接受日期: 2015-05-21; 网络版发表日期: 2015-11-02

国家自然科学基金(批准号: 81321003, 81270427, 81471405)资助

摘要 Sirtuins 作为 III 型蛋白质去乙酰化酶调控机体多种生理进程, 包括 DNA 修复、基因组稳定性、能量代谢、衰老以及癌症发生. 目前已鉴定出 7 种人类 Sirtuins 家族的蛋白(SIRT1–SIRT7), 其组织分布、亚细胞定位以及酶作用的底物都不尽相同. 本文将着重描述 Sirtuins 家族的一个成员——SIRT5 以及其在调控细胞代谢中的多种酶活性.

关键词

Sirtuins

SIRT5

去乙酰化

去丙二酰化

去琥珀酰化

去戊二酰化

哺乳动物 Sirtuins 是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)Sir2(silent information regulator 2)同源性的蛋白家族, 酵母 Sir2 通过催化蛋白质去乙酰化, 在染色质沉默中起作用并保证基因组稳定性和延缓衰老^[1]. Sirtuins 家族有 7 个成员(SIRT1–SIRT7), 都含有进化保守的催化结构域, 该结构域具有催化依赖于 NAD⁺的组蛋白去乙酰化酶活性, 从而调节多种组蛋白和非组蛋白的功能. Sirtuins 的每一个成员都具有不同的功能和细胞定位: SIRT1, 6 和 7 定位于细胞核, SIRT2 定位于胞浆, 而 SIRT3, 4 和 5 定位于线粒体中^[2].

SIRT5 具有多种酶活性的特点使其成为 Sirtuins 家族中独特的成员. SIRT5 是作为一个 NAD⁺依赖的组蛋白去乙酰化酶被鉴定出来的^[3], 最近的研究表

明, 它同时是一个具有 NAD⁺依赖的蛋白质赖氨酸去丙二酰化、去琥珀酰化^[4]以及去戊二酰化^[5]活性的酶. SIRT5 多种酶活性说明它可能在调控细胞代谢中是一个有多重功能的蛋白, 本文将着重描述 SIRT5 的多种酶活性是如何调控细胞代谢的.

1 蛋白质去乙酰化功能

最初, 研究者发现, SIRT5 是定位于线粒体中的蛋白质赖氨酸去乙酰化酶, 它能够将氨甲酰磷酸合成酶 1(carbamoyl phosphate synthetase 1, CPS1)去乙酰化, CPS1 是尿素循环中第一步的限速酶^[3]. 在培养的初代干细胞内以及小鼠(*Mus musculus*)体内的实验表明, 在饥饿条件下, 即有能量限制的环境中, SIRT5 可以直接去乙酰化 CPS1 而调节其活性. 尽管

引用格式: 杨鑫, 刘博雅, 朱卫国, 等. 含有多种酶活性的 SIRT5 蛋白在细胞代谢中的功能. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 1069–1073

英文版见: Yang X, Liu B Y, Zhu W G, et al. SIRT5, functions in cellular metabolism with a multiple enzymatic activities. Sci China Life Sci, 2015, 58: 912–914, doi: 10.1007/s11427-015-4902-8

SIRT5 敲除小鼠没有表现出明显的特征和严重的疾病, 但是 48 h 限食后, SIRT5 敲除小鼠的血氨对比野生型小鼠有明显升高. 同时 SIRT5 过表达(Sirt5-Tg)小鼠也证实了其与 CPS1 的关系. Sirt5-Tg 小鼠中 CPS1 活性和尿素产生都远高于野生型小鼠^[6], 这说明, SIRT5 将 CPS1 去乙酰化从而激活其在尿素循环功能, 从而产生更多尿素. 尽管目前没有发现 SIRT5 的底物中有其他尿素循环中的酶, 但是 SIRT5 仍与调节尿素循环密切相关^[7].

尿酸氧化酶同样是 SIRT5 的一种底物^[8], 在 Sirt5-Tg 小鼠中, SIRT5 将尿酸氧化酶(urate oxidase, UOX)去乙酰化从而激活其酶活性. 此外, 细胞色素 C 作为氧化代谢的关键蛋白也定位在线粒体内膜上, 它同样是 SIRT5 的底物^[9]. Lieber 研究组^[10]发现酒精处理后的肝脏细胞中 SIRT5 作为去乙酰化酶的酶活性会降低.

2 蛋白质去丙二酰化和去琥珀酰化功能

Lin 研究组^[4]通过结构组学分析发现, 相比乙酰基肽段, 一些其他的酰基肽段更容易与 SIRT5 结合, 这些酰基肽段包括琥珀酰基肽以及丙二酰基肽. 这一结论加速了对 SIRT5 的去丙二酰化和去琥珀酰化活性的鉴定. 没有研究发现 Sirtuin 家族其他成员对于酰基肽段特异性结合的现象, 这意味着 SIRT5 为此家族中特殊的一员. 研究者猜测 SIRT5 作为酶所催化的去丙二酰化和去琥珀酰化的机制与 Sirtuin 家族蛋白的去乙酰化的机制相同, 但是这一观点目前尚未被实验证明. 通过液相色谱-质谱/质谱联用(liquid chromatograph-mass spectrometry/mass spectrometry, LC-MS/MS)技术分析, 很多琥珀酰修饰的蛋白被鉴定出来, 如 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合酶 2(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2, HMGCS2)、硫代硫酸硫转移酶(thiosulfate sulfurtransferase)和天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase)^[4].

大肠杆菌(*Escherichia coli*)以及海拉细胞(HeLa)中整体的丙二酰化程度可以通过抗丙二酰化抗体检测到, 此抗体也被用于鉴定有丙二酰基团修饰的蛋白, 从而证实了蛋白丙二酰化是一种新型的蛋白翻译后修饰. 而体内和体外实验确定 SIRT5 蛋白具有赖氨酸去丙二酰化活性, 它能催化蛋白质去丙二酰

化进程^[11].

研究者通过稳定同位素标记技术(stable isotope labeling with amino acids, SILAC), 检测小鼠成纤维细胞(mouse embryo fibroblasts, MEFs)和小鼠肝细胞的蛋白, 发现哺乳动物蛋白有赖氨酸琥珀酰化修饰^[12]. 小鼠成纤维细胞和小鼠肝脏细胞中检测到重复的赖氨酸琥珀酰化修饰位点仅有 294 个, 这表明培养的细胞和小鼠组织中的琥珀酰蛋白组具有巨大的差异. 深入研究发现, 小鼠成纤维细胞中具有琥珀酰化蛋白中有 282 个位点同时被乙酰化和琥珀酰化修饰. 而 SIRT3 已经是公认的调控线粒体中赖氨酸乙酰化和去乙酰化的蛋白, 这项数据提示, 线粒体中很多蛋白是被 SIRT5 和 SIRT3 同时调节的. SIRT5 的缺失可以导致整体的赖氨酸琥珀酰化明显增强, 而对整体的乙酰化程度影响甚微. 有趣的是, SIRT5 还在线粒体外(细胞核中)被发现, 像其他 Sirtuin 家族成员(如 SIRT6)一样, SIRT5 可能通过作用于组蛋白来调节染色体功能.

STRING 数据库分析得到一些有趣的琥珀酰化蛋白组的联系网路, 如 HMGB1-HMGB2-HSC70-ERP60-GAPDH 复合体、PDC 复合体(pyruvate dehydrogenase complex)以及 SDH-mABC1-PIC-ANT-ATPase 复合体, 这些是比较有可信性的蛋白质复合体. 这些复合体的发现更加证实了 SIRT5 的去琥珀酰化酶活性在调节一些重要的生理进程中起作用.

Verdin 研究组^[13]也对 SIRT5 正常和敲除小鼠进行了整体赖氨酸琥珀酰化的测定, 结果显示, SIRT5 敲除小鼠中细胞线粒体蛋白显示高度琥珀酰化. SIRT5 作用的蛋白琥珀酰化位点在检测的 6 种(人、鼠、牛、鸟、蛙和斑马鱼)生物物种中呈现出一定的保守性. 通过对比野生型和敲除 SIRT5 的小鼠肝脏中的代谢情况, 研究组发现敲除小鼠中有明显的脂肪氧化的降低以及酰肉碱(acylcarnitines)的积累. HMGCS2 蛋白的高度琥珀酰化可以直接导致细胞中酮体产生速率的降低^[14]. 动力学分析揭示, SIRT5 通过催化 HMGCS2 的 83 位以及 310 位赖氨酸去琥珀酰化, 导致 HMGCS2 蛋白结构中恢复了对乙酰辅酶 A 的磷酸基团的锚定作用, 最终使酮体产生增加. 同时, 有研究发现, HMGCS2 的去乙酰化是由 SIRT3 调控的, 而不是 SIRT5^[15]. 这证实了上文提到的 SIRT3 和 SIRT5 在调控线粒体蛋白中有共同的作用位点,

二者共同对线粒体中的生理活动进行调节.

有其他研究发现, 铜/锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn superoxide dismutase, SOD1)也可能是 SIRT5 的底物, 它可以被 SIRT5 的去琥珀酰化而激活, 加快消除体内活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)^[16]. SIRT5 也可以被其他的蛋白调控, 例如, 过氧化物酶体增殖物受体 γ 共激活因子 1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1- α , PGC-1 α)和磷酸腺苷蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)可以通过 SIRT5 mRNA 水平的调节来改变细胞中整体的琥珀酰化水平^[17].

3 蛋白质去戊二酰化功能

研究者主要使用质谱技术, 通过蛋白质戊二酰化修饰组学研究, 鉴定出了 191 个氨基酸包含的 683 个戊二酰化修饰位点^[5], 并证明了蛋白质戊二酰化在线粒体及其细胞代谢中是广泛存在的. 体外的去戊二酰化实验则证实, SIRT5 的去戊二酰化活性依赖于 NAD⁺, 而尼克酰胺(nicotinamide, NAM)则可以抑制它的去戊二酰化活性, 而 Sirtinol、曲古菌素 A(trichostatin A, TSA)、丁酸钠则对其活性没有影响. 与之相反, SIRT3 和 SIRT4 则完全不具有去戊二酰化活性.

CPS1 是 SIRT5 去戊二酰化的一个重要底物. 最新研究显示, SIRT5 敲除鼠表现出了广泛高戊二酰化的特点, 限食处理后 CPS1 有高度戊二酰化表象. SIRT5 敲除鼠也表现出对饮食结构变化的高度敏感性. 戊二酰-辅酶 A 脱氢酶(GCDH)是人类 I 型戊二酸血症的关键蛋白. 与野生型小鼠相比, GCDH 敲除小鼠中 CPS1 表达提高, 这些结果说明细胞可以通过内部调节维持戊二酰化活性与蛋白量之间的平衡. GCDH 敲除鼠高表达戊二酰-辅酶 A, 说明戊二酰-辅酶 A 很可以直接导致戊二酰化修饰, 进一步的实验需要去验证戊二酰-辅酶 A 是否直接与蛋白质戊二酰化相关, 从而研究赖氨酸戊二酰化和去戊二酰化的机制.

4 总结

SIRT5 主要存在于线粒体中, 但细胞其他组分中也同样发现它的存在. SIRT5 和组蛋白之间的关系以及和 SIRT3 蛋白在细胞核中的共表达说明, SIRT5 可能在调控细胞功能中起到更多的作用^[18]. 作为目前鉴定出来的具有 NAD⁺依赖的去琥珀酰化和去戊二酰化酶活性的蛋白, 细胞线粒体外的整体的琥珀酰化和戊二酰化可能与 SIRT5 在线粒体外同样起作用相关.

相比于 SIRT4 和 SIRT5, SIRT3 在线粒体蛋白的去乙酰化中发挥了主要作用, SIRT4 和 SIRT5 敲除鼠相比于野生型鼠, 线粒体的整体乙酰化水平并没有改变^[19], 然而 SIRT3 敲除鼠表现出了明显的总体高乙酰化水平. 以上结果说明, SIRT3 在线粒体去乙酰化作用中起到了重要作用. SIRT5 的去乙酰化活性要比它的去丙二酰化和去琥珀酰化活性弱很多(有 1000 倍左右的差异). 这个结果反应出 SIRT5 主要是通过去丙二酰化、去琥珀酰化和去戊二酰化而不是去乙酰化来调节蛋白功能.

在 SIRT5 敲除鼠中, 许多线粒体蛋白的 mRNA 水平并没有很大的改变, 由此可以推测, 当一个酶的活性或者量减少时, 为了应对这种变化, 其他的酶可能被上调或者下调. 这种现象在三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)和氨基酸代谢等核心代谢中表现得非常明显. 下游的产物可以被上游产物及酶活性影响. 尽管目前通过蛋白质修饰组学的研究已经发现了 SIRT5 在调节细胞代谢中发挥重要的功能(图 1), 研究者们仍需将未来的工作重点放到研究 SIRT5 的直接作用底物以及发现它如何在调节具体生物过程中起作用.

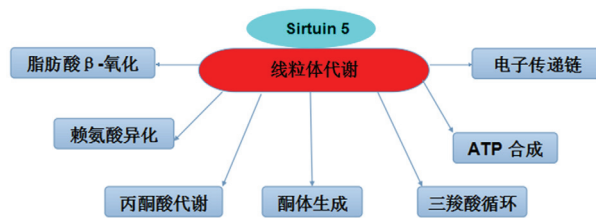


图 1 SIRT5 调节的代谢通路

参考文献

- 1 Imai S, Armstrong C M, Kaeberlein M, et al. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase.

- Nature, 2000, 403: 795–800
- 2 Haigis M C, Sinclair D A. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol*, 2010, 5: 253–295
 - 3 Nakagawa T, Lomb D J, Haiqis M C, et al. SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell*, 2009, 137: 560–570
 - 4 Du J, Zhou Y, Su X, et al. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science*, 2011, 334: 806–809
 - 5 Tan M, Peng C, Anderson K A, et al. Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5. *Cell Metab*, 2014, 19: 605–617
 - 6 Ogura M, Nakamura Y, Tanaka D, et al. Overexpression of SIRT5 confirms its involvement in deacetylation and activation of carbamoyl phosphate synthetase 1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393: 73–78
 - 7 Nakagawa T, Guarente L. Urea cycle regulation by mitochondrial sirtuin, SIRT5. *Aging (Albany NY)*, 2009, 1: 578–581
 - 8 Nakamura Y, Ogura M, Ogura K, et al. SIRT5 deacetylates and activates urate oxidase in liver mitochondria of mice. *FEBS Lett*, 2012, 586: 4076–4081
 - 9 Schlicker C, Gertz M, Papatheodorou P, et al. Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5. *J Mol Biol*, 2008, 382: 790–801
 - 10 Lieber C S, Leo M A, Wang X, et al. Alcohol alters hepatic FoxO1, p53, and mitochondrial SIRT5 deacetylation function. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 373: 246–252
 - 11 Peng C, Lu Z, Xie Z, et al. The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10: M111.012658
 - 12 Park J, Chen Y, Tishkoff D X, et al. SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways. *Mol Cell*, 2013, 50: 919–930
 - 13 Rardin M J, He W, Nishida Y, et al. SIRT5 regulates the mitochondrial lysine succinylome and metabolic networks. *Cell Metab*, 2013, 18: 920–933
 - 14 Lowe D M, Tubbs P K. Succinylation and inactivation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase by succinyl-CoA and its possible relevance to the control of ketogenesis. *Biochem J*, 1985, 232: 37–42
 - 15 Shimazu T, Hirschey M D, Hua L, et al. SIRT3 deacetylates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase 2 and regulates ketone body production. *Cell Metab*, 2010, 12: 654–661
 - 16 Lin Z F, Xu H B, Wang J Y, et al. SIRT5 desuccinylates and activates SOD1 to eliminate ROS. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441: 191–195
 - 17 Buler M, Aatsinki S M, Izzi V, et al. SIRT5 is under the control of PGC-1 α and AMPK and is involved in regulation of mitochondrial energy metabolism. *FASEB J*, 2014, 28: 3225–3237
 - 18 Nakamura Y, Ogura M, Tanaka D, et al. Localization of mouse mitochondrial SIRT proteins: shift of SIRT3 to nucleus by co-expression with SIRT5. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 366: 174–179
 - 19 Lombard D B, Alt F W, Cheng H L, et al. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol*, 2007, 27: 8807–8814

SIRT5, Functions in Cellular Metabolism with a Multiple Enzymatic Activities

YANG Xin¹, LIU BoYa¹, ZHU WeiGuo² & LUO JianYuan^{1,3}

1 Department of Medical Genetics, School of Basic Medical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China;

2 Department of Biochemistry, School of Basic Medical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China;

3 Department of Medical & Research Technology, School of Medicine, University of Maryland, Baltimore 21201, USA

Sirtuins, a class III Histone deacetylases, play an important role in regulation of numerous physiological processes including DNA repair, genomic stability, energy metabolism, aging and tumorigenesis. Seven Sirtuins (SIRT1–SIRT7) have been identified, which vary in tissue distribution, subcellular localization, and enzymatic targets. In this review, we will focus on one of the family members, SIRT5 and its functions in cellular metabolism with the regulation of multiple enzymatic activities.

Sirtuins, SIRT5, deacetylation, demalonylation, desuccinylation, deglutarylation

doi: 10.1007/s11427-015-4902-8