

E3 连接酶 RNF148 泛素化降解 TSPAN15*

索塔林^{1, 2)} 唐捷^{1)**}

(¹⁾ 中国科学院生物物理研究所, 感染免疫中心, 北京 100101; (²⁾ 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 真核生物蛋白的泛素化是细胞维持对某些受组成型调节和环境刺激产生的蛋白质水平的基本调节方式, 泛素-蛋白酶体途径对蛋白质降解、运输和免疫反应过程的控制等细胞功能起着非常重要的作用。本研究揭示了一个功能未知、具有 RING 结构特征的 I 型穿膜蛋白 RNF148 的泛素化降解功能。通过流式筛选、免疫共沉淀、浓度梯度依赖降解实验及泛素化检测等实验证明: RNF148 与四跨膜区蛋白(tetraspanin)家族的一个成员 TSPAN15 有相互作用, 即 RNF148 可以泛素化并降解 TSPAN15。RNF148 的 RING 结构被突变后, TSPAN15 的泛素化被严重影响; 而 TSPAN15 的 N 端胞浆段的 21 位赖氨酸和 C 端 278 位赖氨酸被突变为精氨酸后, RNF148 对其泛素化的程度也降低。TSPAN15 经由 RNF148 泛素化后会连接 K29 位或 K63 位多泛素链, 进而导致 TSPAN15 的转位或降解。本研究证明 RNF148 作为泛素连接酶可以泛素化降解 TSPAN15。

关键词 RNF148, TSPAN15, E3 连接酶, 泛素, 四跨膜区蛋白(tetraspanin)

学科分类号 Q5, Q2

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00053

真核细胞中蛋白质的泛素化在细胞功能调节方面起着非常重要的作用。这些泛素化作用在细胞基本进程(如 DNA 修复、细胞周期调控、细胞凋亡等)、抗原呈递、炎症反应等一系列通路中扮演重要角色^[1]。三种关键的酶共同介导了泛素化过程, 包括泛素活化酶 E1、泛素结合酶 E2 和泛素连接酶 E3。在蛋白质被泛素化修饰的过程中, 首先由 E1 通过其活性中心的 Cys 残基与泛素的 C 端形成硫酯键以活化单个游离的泛素, 然后 E1 将活化的泛素递交给 E2, 最后由 E3 募集特异的底物和 E2, 并介导泛素从 E2 转移到底物靶蛋白^[2]。在大部分的泛素化过程中, 特异的 E3 决定了底物蛋白的选择和泛素的连接, 所以 E3 被认为是泛素化过程中最为关键的酶。许多带有 RING 锌指结构域(really interesting new gene)的蛋白质具有 E3 连接酶的功能。RING 锌指结构是由 40~60 个氨基酸组成,

结合 2 个锌原子, 具有 C-X2-C-X(9-39)-C-X(1-3)-H-X(2-3)-(N/C/H)-X2-C-X(4-48)-C-X2-C “交叉支柱”特征的特殊锌指结构^[3]。人 RNF148 基因位于人类第七号染色体长臂上。RNF148 蛋白结构中具有 RING 锌指结构特征。我们推测此基因很可能具有 E3 连接酶功能。为了找到 RNF148 的功能, 我们对比了人 RNF148 和已知功能的人 RNF128(gene related to anergy in lymphocytes, GRAIL)的蛋白质序列结构, 发现它们的 RING 结构序列有较高同源性。RNF128 胞外段具有 PA(protease-associated)结构域, 推测其可以作为蛋白质-蛋白质相互作用基

* 国家“十一五”传染病重大专项(2008ZX10002-008)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 001-408-6097577, E-mail: jtang@ibp.ac.cn

收稿日期: 2013-02-01, 接受日期: 2013-03-12

序. RNF148 的胞外段也有 PA 结构域, 它同 RNF128 一样也是 I 型跨膜蛋白, RING 结构位于其胞内段. RNF128 是 E3 连接酶. 在 RNF128 泛素化 CD40L 并使其降解实验中, 证明其 PA 结构域具有结合底物 CD40L 的作用^[4]. CD40L 被 RNF128 泛素化后降解是导致 T 细胞无能的原因. 在人或小鼠的静息初始 CD4 T 细胞中都表达 RNF128, 当 RNF128 趋于不稳定被蛋白酶体降解后, 可使 T 细胞激活增殖^[5]. 此外, 有文献报道 RNF128 与 tetraspanin(四跨膜蛋白)家族分子有相互作用^[6]. Tetraspanin 家族分子是一类小的膜蛋白分子, 从海绵到哺乳类等各种物种的各个器官都有表达. Tetraspanin 参与多样的生物学过程, 例如生殖、寄生虫和病毒感染、神经肌肉接头处的突触连接、血小板聚集、抑制肿瘤侵袭、促进肿瘤发生等功能. 在进化上的保守性和如此多样的功能决定了 tetraspanin 分子是一类非常重要的分子^[7]. 已知功能的 tetraspanin 分子有 CD9、CD63、CD81、CD82、CD151、CD37 和 CD53 等. 基于 RNF148 与 RNF128 结构上具有相似性, 我们认为从 tetraspanin 家族分子中筛选到 RNF148 底物的可能性较大.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和基因.

实验中使用的主要哺乳动物表达载体为 pCI-neo, 购自 Promega 公司, 根据实验需要对此表达载体进行了带各种 tag 的改造. 质粒载体 HA/pCI(2 个 HA 的 tag 融合表达在目的基因的 C 端), Flag/pCI(2 个 flag 的 tag 融合表达在目的基因的 C 端), Myc/pCI(Myc 的 tag 融合表达在目的基因的 N 端), RFP/pCI(RFP 序列融合表达在目的基因的 C 端), eGFP/pCI(eGFP 序列融合表达在目的基因的 C 端)等均为 pCI-neo 表达载体改造而来.

人的 TSPAN15 及 RNF148 基因, 均从细胞系 REH 的 RNA 中反转录得到的 cDNA 中克隆取得. RNF148: 上游引物, 5' CGGCTAGCATGAGCTTCCTTAG 3'; 下游引物, 5' GCGTCGACAGTTTTCAGGATGTC 3'; TSPAN15: 上游引物, 5' CGGCTAGCATGCCGCGCGGGGACTCG 3'; 下游引物, 5' GCGTCGACATTGGGGTAGCAC 3'.

1.1.2 主要试剂.

分子生物学实验中使用的质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化公司; Pyrobest 聚合酶、限制性内切酶、dNTP、RNase 抑制剂、T 载体和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司和 NEB 公司; PMSF、Aprotinin、Leupeptin、Pepstatin 购自 Sigma 公司和 Invitrogen 公司; MG132 购自 CalBiochem 公司; DMEM、Opti-MEM 购自 Hyclone 公司; Protein A/G Beads 购自 Santa Cruz 公司; ECL 底物显色液购自 GE HealthCare 公司; MitoTracker Red、LysoTracker Red、ER-Tracker Dye 等细胞器探针均购自 Molecular Probe 公司; Myc 抗体、Flag 抗体、HA 抗体、羊抗鼠 IgG-HRP、 β -tubulin 抗体等均购自 sigma 公司; 羊抗鼠 IgG-FC 段 -HRP 购自 Thermo Scientific 公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养. K562 细胞、HeLa 细胞和 HEK293T 细胞用含有 10% FCS (fetal calf serum)、100 U/ml 青霉素和 100 g/L 链霉素的 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)培养液在 37℃, 5% CO₂细胞培养箱培养.

1.2.2 定点突变. 将 RNF148 第 258 位和 261 位的半胱氨酸残基突变为丝氨酸, 命名为 RNF148CS-HA/pCI. 将 TSPAN15 的第 21 位和第 278 位赖氨酸残基突变为精氨酸, 命名为 TSPAN15K21-278R-Flag/pCI. 突变位点设计在引物中, 以野生型 RNF148 和 TSPAN15 的质粒为模板, 经 PCR 得到突变的片段, 再连入相应的 pCI-HA 和 pCI-Flag 载体测序验证.

1.2.3 转染.

a. FuGENE HD 转染.

5×10⁵ 个 HEK293T 细胞铺于直径 60 mm 的细胞培养皿中, 经 12 h 培养后, 用 FuGENE HD 转染试剂瞬时转染质粒总量为 7.5 μ g, 36 h 后进行相关检测试验.

b. 核转.

K562 细胞被收集至 50 ml 离心管中 1×PBS 洗 2 次. 经细胞计数后, 于室温 1000 r/min 离心 5 min. 2×10⁶ 个细胞重悬于 100 μ l 核转染试剂 Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza, Basel, Switzerland)中. 将此混合物转入含有 8 μ g 质粒的

管中, 轻柔混合, 移入核转杯中. 核转仪 AMAXA Nucleofector I 的核转程序为 T-016. 核转完成后, 加入 800 μ l 预温的 DMEM 全培养基(10% FCS)重悬细胞, 移入 1.5 ml 离心管中, 于室温 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用 DMEM 全培养基将细胞重悬, 铺于 48 孔细胞培养板中, 细胞计数为 2×10^5 个细胞/孔. 37℃, 5% CO₂ 细胞培养箱培养 15 h 后用流式细胞仪检测.

1.2.4 细胞裂解和免疫共沉淀(IP).

用冰预冷的 PBS 洗细胞 2 次, 除去残留的培养液和血清, 将 PBS 彻底吸除干净. 在 IP 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5% NP40, 5 mmol/L MgCl₂)中加入适量的蛋白酶抑制剂(1 mmol/L PMSF, 1 mg/L 抑酶肽, 1 mg/L 亮抑酶肽, 1 mg/L 抑胃酶肽), 然后直接加到细胞培养皿中(60 mm 的培养皿中加入 700 μ l), 将培养皿前后摇匀后冰上放置 30 min 充分裂解. 将全细胞裂解液转移到 1.5 ml 的离心管中, 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min. 收集上清裂解液, 取出 40 μ l 作为全细胞裂解液样品(whole cell lysis, input). 剩下的约 650 μ l 裂解液中加入适量抗体(一般对于长满细胞的 60mm 培养皿的裂解液, 加入 1 μ g 抗体), 4℃ 混合翻转 1 h. 加入 10 μ l protein A/G Beads, 4℃ 或者冰上混合翻转 40 min. 4℃ 3 000 r/min 离心 3 min 收集 protein A/G Beads, 保留第一次离心的上清(可以取样检测 IP 的效率). 用 IP 缓冲液洗涤 Beads 至少 4 次, 每次 1 ml. 去除最后一次离心的上清, 加入适量的 IP 缓冲液(一般 40 μ l)重悬 Beads. 加入适量的 5 $\times$ 样品缓冲液, 100℃ 煮样 5 min, SDS-PAGE 电泳, 或者置于 -20℃ 保存.

进行泛素化检测时, 裂解细胞前将细胞与 MG132 (10 μ mol/L)于 37℃ 细胞培养箱内孵育 4 h. 裂解时所用缓冲液为 TSE 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, protease inhibitor cocktail). 裂解的细胞用 0.5% SDS, 100℃ 加热 10 min 以期打断 RNF 分子与其底物的相互作用, 之后将此变性裂解液稀释至含有 0.1% SDS 的 TSE 缓冲液中进行 IP 实验.

1.2.5 蛋白质印迹(Western blotting). 用冰预冷的 PBS 洗细胞 2 次. 细胞于 TSE 缓冲液(50 mmol/L

Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, protease inhibitor cocktail) 中裂解. 冰上放置 30 min 充分裂解. 将全细胞裂解液转移到 1.5 ml 的离心管中, 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min. 收集上清裂解液, 加入适量的 5 $\times$ 样品缓冲液, 100℃ 煮样 5 min, 10% SDS-PAGE 电泳. 转膜及 10%脱脂奶粉封闭室温 1 h, 加入适当浓度一抗, 室温 1 h. 去除一抗, 在摇床上 10~20 ml TBST 溶液振荡洗膜 3 次 $\times$ 10 min, 加入 1:10 000 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h. 去除二抗, 在摇床上 10~20 ml TBST 溶液振荡洗膜 3 次 $\times$ 10 min. 加入 ECL 底物显色液, 暗室 X 光片检测条带.

1.2.6 细胞器的染色. 实验中对常见细胞器(线粒体、溶酶体和内质网)的染色采用 Molecular Probe 公司探针, 实验操作按照试剂说明书进行.

2 结 果

2.1 E3 连接酶 RNF148 可与 tetraspanin 家族中的 TSPAN15 相互作用

已知 RNF128 与 tetraspanin 家族分子有相互作用^[9]. 为了找到 RNF148 的功能, 根据 RNF148 与 RNF128 的 RING 结构有 73% 同源性(图 1), 我们认为从 tetraspanin 家族分子中筛选到 RNF148 底物的可能性较大. 我们克隆了 T、B 细胞上可能表达的 tetraspanin 家族的分子如: CD37、CD82、CD53、TSPAN13 (简称 TS13, 又名 NET-6)、TSPAN15 (简称 TS15, 又名 NET-7)、TSPAN3 和 TSPAN32 等, 统称 TSPANs. 同时构建了 RFP-IRES-TSPANs-EGFP/pCI 载体, 使这些 TSPANs 的 C 端带有绿色荧光蛋白. 红色荧光蛋白作为一个荧光内参照, 当只有 RFP-IRES-TSPANs-EGFP/pCI 载体转入细胞时, 由于有 IRES 序列存在, RFP 与 TSPANs-GFP 会分别表达, GFP/RFP 是一个定值. 如果在转染 RFP-IRES-TSPANs-EGFP/pCI 时同时转染一个能降解 TSPANs 的 E3 连接酶, GFP/RFP 的比值会下降. 在此实验中, 将 RNF148 和对照 RNF128 分别与 RFP-IRES-TSPANs-EGFP/pCI 载体共转入 K562 细胞后, 用流式细胞仪测量每种细胞的绿色荧光与红色荧光强度的比值, 如果 RNF148 组的比值比对照组小, 说明该组的 TSPANs 被 RNF148 降解的可能性更大.



Fig. 1 Sequence alignment of human RNF128 and RNF148 RING domains

Conserved residues required for zinc binding are boxed.

从流式筛选的结果可以初步推测出 RNF148 的底物可能为 TSPAN15(图 2)。为了确定 TSPANs 和 RNF148 是否有相互作用, 我们用 TSPANs 与 RNF148 做免疫共沉淀(IP)实验, 即在 HEK293T 细胞中过表达 RNF148-HA/PCI 和 TSPANs-Flag/PCI 质粒, 用 Flag 小鼠单抗免疫沉淀 TSPANs, 用 HA 小鼠单抗做蛋白质印迹(Western blot)。通过 IP 实验, 进一步确定 TSPAN15 和 RNF148 有相互作用, 结果见图 3a。从图 3a 中可见 RNF148 和 TSPAN15 共转 HEK293T 细胞后, 在富含 TSPAN15 的分子中检测到 RNF148 阳性条带, 而且 TSPAN15 的蛋白量明显少于空载体 PCI-HA 和 TSPAN15 共转后 TSPAN15 的表达量。

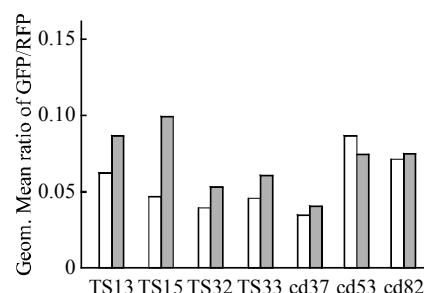


Fig. 2 Screening the substrate of RNF148 by FACS

Several TSPANs genes were cloned into RFP -IRES- TSPANs-EGFP/pCI vector and transiently co-transfected into K562 cell line together with RNF148 or RNF128 plasmid. The ratio of Geom. Mean of TSPANs-EGFP to that of RFP was calculated. □: RNF148; ■: RNF128.

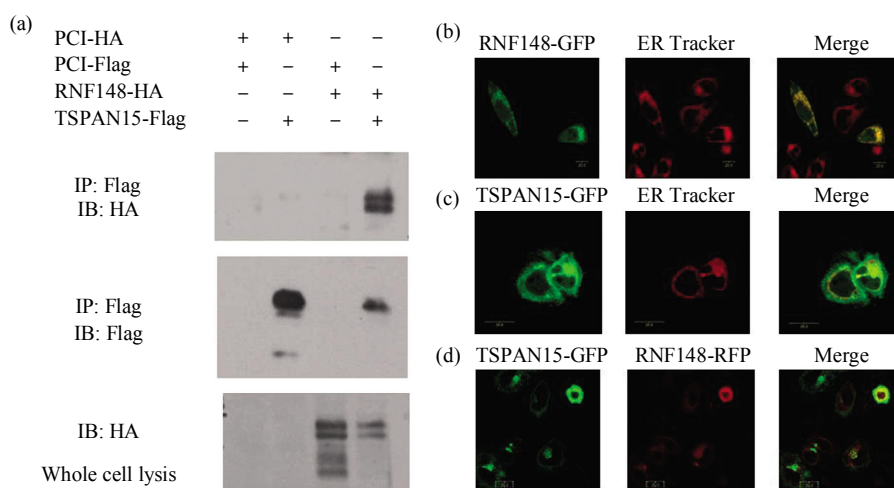


Fig. 3 Interaction between RNF148 and TSPAN15 in mammalian cells

(a) HEK293T cells were co-transfected with expression constructs for both HA-tagged human RNF148 and Flag-tagged human TSPAN15 or empty vectors as control. Cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-Flag and protein A/G agarose beads and immunoblotted (IB) with anti-HA and anti-Flag. (b, c) Subcellular localizations of RNF148-GFP/pCI or of TSPAN15-GFP/pCI in 24 h post-transfected HeLa cells stained with ER-Tracker Red for 30 min and analyzed by confocal microscopy. (d) Co-localization of transfected RNF148-RFP/pCI and TSPAN15-GFP/pCI in HeLa cells 24 h post-transfection.

为了研究 RNF148 和 TSPAN15 在细胞内的定位以及二者的共定位, 我们将 RNF148 或 TSPAN15 的 C 端融合荧光蛋白表达. 共聚焦的实验结果表明(图 3b, c), RNF148 定位在内质网. TSPAN15-GFP 在细胞膜有大量的表达, 在内质网也有定位. 在图 3d 中可见, RNF148 和 TSPAN15 有共定位, 但不位于细胞膜表面, RNF148 和 TSPAN15 的共定位也有点状分布.

2.2 RNF148 可以降解 TSPAN15

从前述免疫共沉淀(图 3a)结果看, RNF148 可以降解 TSPAN15. 为了进一步确证这种降解是否有浓度依赖性, 在 HEK293T 细胞中转染了浓度递减的 RNF148-HA/PCI 质粒及定量的 TSPAN15-Flag/PCI 质粒后, RNF148 对 TSPAN15 蛋白质稳定性的影响可见于实验结果(图 4).

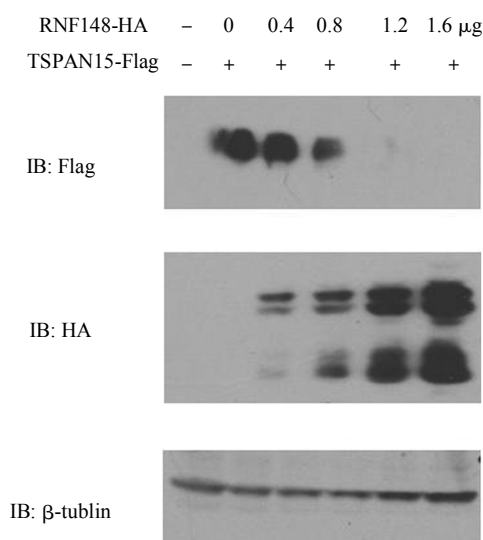


Fig. 4 RNF148 down-regulates TSPAN15

HEK 293T cells were transfected with 0.4 μ g of TSPAN15-Flag/pCI and RNF148-HA/pCI at 0, 0.4, 0.8, 1.2 and 1.6 μ g (empty HA vector was added for a total of 1.6 μ g of total HA plasmid for each transfection). Cell lysates were separated by SDS-PAGE and blotted with the indicated antibodies.

当 RNF148 浓度降低时, TSPAN15 更趋于稳定而不被降解. RNF148 可以降解 TSPAN15, 而 RNF148 蛋白结构中具有 RING 结构域特征, 这提

示我们 RNF148 有可能通过泛素化 TSPAN15 后使其降解.

2.3 RNF148 参与 TSPAN15 的多泛素化修饰

为了检验 RNF148 对 TSPAN15 的泛素化, 我们构建了由 RNF148-HA/PCI、TSPAN15-Flag/PCI、Myc-Ub 及各自空载体组成的检测 TSPAN15 泛素化的体系. 从图 5a 可知, 与空载体 HA 相比, 在转染 RNF148 后, TSPAN15 的泛素化明显增加. 在全细胞裂解液中, 当 RNF148 与 TSPAN15 共转染后, RNF148 较小片段减少, 而 TSPAN15 的较大片段减少. 为进一步证明 TSPAN15 的泛素化与 RNF148 的 RING 结构功能直接相关, 将 RNF148CS-HA 序列克隆入 PCI 载体, 命名为 RNF148CS-HA/pCI 质粒. 从图 5b 中左侧图可知, RNF148CS-HA/pCI 与 TSPAN15-Flag/pCI 共转后, 未见明显 TSPAN15 多泛素化条带(基本和空载体一致). 从图 5b 中右侧图可知加入 MG132(蛋白酶体抑制剂)的一组细胞中, 与 RNF148 共转 TSPAN15 的多泛素化现象(右侧图中间一列)远较未加 MG132(左侧图中间一列)一组明显. 对比相应的 TSPAN15 的量, 可以发现空对照组和 RNF148CS-HA/pCI 组的 TSPAN15 蛋白量都高于 RNF148-HA/pCI 组.

泛素是 76 个氨基酸组成的小分子蛋白, 自身有 7 个赖氨酸残基位点, 可以异肽键与其他泛素分子形成多聚泛素链. 我们构建了几个较常见的泛素赖氨酸突变质粒, 单突变的有: Myc-UbK48R/PCI、Myc-UbK63R/PCI、Myc-UbK29R/PCI, 双突变的有: Myc-UbK48 63R/PCI、Myc-UbK29 48R/PCI、Myc-UbK29 63R/PCI. 从图 5c 结果可知, TSPAN15 的泛素化在 Myc-UbK63R/PCI、Myc-UbK29R/PCI 及前述三个泛素双突变质粒表达时与野生型泛素相比皆有减弱.

泛素分子优先结合在靶蛋白的赖氨酸残基上, 为了进一步验证 TSPAN15 是被泛素化机制调节的蛋白, 将其 N 端胞浆段的 21 位赖氨酸和 C 端 278 位赖氨酸突变为精氨酸, 质粒命名为 TSPAN15K21, 278R-Flag/pCI. 从图 5d 结果可看出, 在突变 TSPAN15 胞内段 N 端和 C 端两个可能泛素化位点后, 它被 RNF148 泛素化的程度与野生型 TSPAN15 相比有所减弱, 但比空载体泛素化条带要强, 说明 TSPAN15 还有其他位点可以被泛素化.

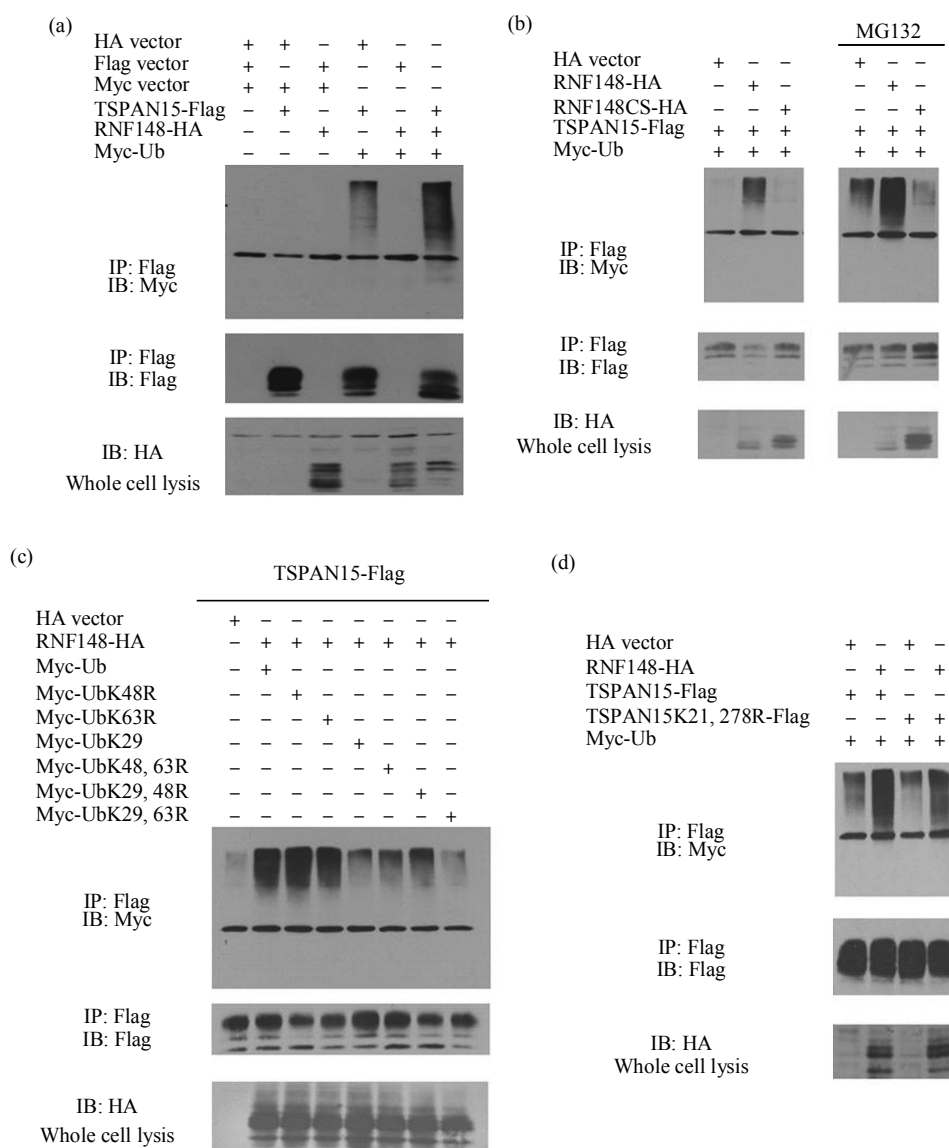


Fig. 5 RNF148 ubiquitination requires the RING domain and results in TSPAN15 degradation

(a) Following transfection with RNF148-HA/pCI or HA/pCI; TSPAN15-Flag/pCI, or vector alone; and Myc-tagged ubiquitin (Ub), HEK293T cells were incubated with MG132 for 4 h prior to lysis to enrich for ubiquitinated proteins. Cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-Flag and protein A/G beads and immunoblotted (IB) with anti-Myc and anti-HA. (b) Left: HEK293T cells were transfected with RNF148-HA/pCI, RNF148CS-HA/pCI, or vector alone constructs; TSPAN15-Flag/pCI; and myc-tagged ubiquitin. Right: transfected HEK293T cells were incubated with MG132 for 4h prior to lysis to enrich for ubiquitinated proteins. Cell lysates were denatured in SDS, diluted in lysis buffer. Cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-flag and protein A/G agarose beads, and immunoblotted (IB) with anti-myc and anti- HA. (c) HEK293T cells were transfected with RNF148-HA/pCI or vector alone, TSPAN15-Flag/pCI, and either Myc-tagged wild-type ubiquitin (Ub), K48R ubiquitin, K63R, K29R, K48, 63R, K29, 48R, or K29, 63R ubiquitin. Cell lysates were denatured in SDS, diluted in lysis buffer, immunoprecipitated (IP) with anti-flag and protein A/G agarose beads, and immunoblotted (IB) with anti-myc and anti- HA. (d) HEK293T cells were transfected with either RNF148-HA/pCI or vector alone, Flag-tagged TSPAN15 or TSPAN15K21, 278R, and Myc-tagged ubiquitin (Ub). Cell lysates were denatured in SDS, immunoprecipitated (IP) with anti-flag and protein A/G agarose beads, and immunoblotted (IB) with anti-myc and anti- HA.

3 讨 论

文献中对具有跨膜结构的 E3 连接酶报道较

少。在本研究中，我们证明 RNF148 是具有跨膜结构的 E3 连接酶。用 IP 实验、共聚焦共定位及浓度梯度依赖降解实验(图 3, 4)验证了 RNF148 与

TSPAN15 有相互作用, 且 RNF148 可以降解 TSPAN15. 对 TSPAN15 的降解是否与 RNF148 的 E3 连接酶功能有关? 结合 TSPAN15 泛素化(图 5 a~d)和 IP 实验结果(图 3a)及 RNF148 对 TSPAN15 降解(图 4)的结果, 我们认为 TSPAN15 的降解与 RNF148 对其泛素化修饰非常相关. RNF148 的 RING 结构被突变后, TSPAN15 的泛素化受到严重影响(图 5b 左侧图), 说明 RNF148 的 RING 结构域是其发挥 E3 连接酶功能的重要结构, RNF148 作为 E3 连接酶可以泛素化降解 TSPAN15.

MG132 作为蛋白酶体抑制剂加入 4 h 后(图 5b 右侧图), TSPAN15 的多泛素化分子被累积, 明显多于未加 MG132 组, 提示 TSPAN15 有可能通过蛋白酶体降解. 此外, 在 TSPAN15 分子的第 4 个跨膜区有 Y-X-X-Φ 特征的酪氨酸基序 Y-L-W-L, 带有此序列的 TSPANs 分子有可能经 Clathrin- 依赖的内吞途径(如 AP-1 或 AP-3 衔接蛋白复合体依赖的内吞途径), 被内吞至溶酶体^[9]. TSPAN15 分子是否经 Clathrin- 依赖的内吞途径被内吞至溶酶体? 还需进一步使用不同的胞吞抑制剂来验证. 结合图 3d 的结果: 当 RNF148 与 TSPAN15 共定位时, 也有点状共定位的现象出现, 它们位于溶酶体还是内体是需要进一步甄别的. MG132 除了作为蛋白酶体抑制剂外, 还可以抑制溶酶体中的半胱氨酸蛋白酶. 鉴于 TSPAN15 具有酪氨酸基序, 有可能被胞吞至溶酶体降解, 不能完全排除 TSPAN15 被 RNF148 泛素化后被胞吞至溶酶体降解的可能性. 泛素赖氨酸 48 位形成的多泛素链经常导致蛋白质经由蛋白酶体降解. 泛素赖氨酸 63 位形成的多泛素链可以稳定或激活底物蛋白分子, 多和蛋白质转运有关^[9]. 泛素赖氨酸 29 位形成的多泛素链有的经蛋白酶体降解^[10], 但也有报道会经溶酶体降解^[11]. TSPAN15 在 E3 连接酶 RNF148 的参与下, 可以形成 K29 和 K63 两种多聚泛素链(图 5d), K29 修饰可能使 TSPAN15 经由蛋白酶体降解, K63 修饰可能使 TSPAN15 转位. 这就给 TSPAN15 被泛素化后经由蛋白酶体或溶酶体降解提供可能性.

RNF148 与 RNF128 RING 结构同源性较高. RNF128 是一个在细胞免疫学功能方面十分重要的分子, 其高表达和 T 细胞无能相关. 这提示 RNF148 可能在细胞的免疫反应中起作用. 虽然在 RNF128 与 tetraspanin 家族分子有相互作用的文献报道中所涉及的 tetraspanin 分子 CD151 的功能多与肿瘤相关^[12], 但是另一个与 RNF128 有相互作用

的 tetraspanin 分子 CD81 作为 HCV 的受体, 明显与病毒感染的免疫反应相关^[13]. 人 tetraspanin 家族分子目前发现有 33 个, 我们克隆的大部分 TSPANs 是功能未知的分子. 对于 TSPAN15(又名 NET-7)分子来说, 所涉及报道仅限于对其在不同细胞系表达情况的研究及综述中对其序列的分析^[8, 14]. TSPAN15 分子不但在 Myeloid 细胞系和淋巴细胞系有表达, 在多个肿瘤细胞系及成纤维细胞系也有表达, 这提示 TSPAN15 分子可能是一个功能相对重要的分子. 进一步阐明 TSPAN15 的生物学功能可以完整地揭示 RNF148 在细胞中的调控作用: RNF148 蛋白水平的升高或降低都直接影响 TSPAN15 相关细胞功能的变化. 这是我们下一步工作的目标.

参 考 文 献

- [1] Pickart C M. Back to the future with ubiquitin. *Cell*, 2004, **116**(2): 181-190
- [2] Pickart C M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 2001, **70**: 503-533
- [3] Freemont P S, Hanson I M, Trowsdale J. A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell*, 1991, **64**(3): 483-484
- [4] Lineberry N B, Su L L, Lin J T, *et al.* Cutting edge: The transmembrane E3 ligase GRAIL ubiquitinates the costimulatory molecule CD40 ligand during the induction of T cell anergy. *J Immunol*, 2008, **181**(3): 1622-1626
- [5] Lin J T, Lineberry N B, Kattah M G, *et al.* Naive CD4 T cell proliferation is controlled by mammalian target of rapamycin regulation of GRAIL expression. *J Immunol*, 2009, **182**(10):5919-5928
- [6] Lineberry N, Su L, Soares L, *et al.* The single subunit transmembrane E3 ligase gene related to anergy in lymphocytes (GRAIL) captures and then ubiquitinates transmembrane proteins across the cell membrane. *J Biol Chem*, 2008, **283**(42):28497-28505
- [7] Hemler M E. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6**(10): 801-811
- [8] Berditchevski F, Odintsova E. Tetraspanins as regulators of protein trafficking. *Traffic*, 2007, **8**(2): 89-96
- [9] Pickart C M, Fushman D. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, **8**(6): 610-616
- [10] Adhikari A, Chen Z J. Diversity of polyubiquitin chains. *Dev Cell*, 2009, **16**(4): 485-486
- [11] Chastagner P, Israel A, Brou C. Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO Rep*, 2006, **7**(11): 1147-1153
- [12] Kohno M, Hasegawa H, Miyake M, *et al.* CD151 enhances cell motility and metastasis of cancer cells in the presence of focal adhesion kinase. *Int J Cancer*, 2002, **97**(3): 336-343
- [13] Martin F, Roth D M, Jans D A, *et al.* Tetraspanins in viral

- infections: a fundamental role in viral biology?. J Virol, 2005, 79(17): 10839–10851
- seven new tetraspans. Biochim Biophys Acta, 2000, 1478 (1): 159–163
- [14] Serru V, Dessen P, Boucheix C, *et al.* Sequence and expression of

E3 Ligase RNF148 Ubiquitinates and Down-regulates TSPAN15*

SUO Ta-Lin^{1,2)}, TANG Jie¹⁾**

⁽¹⁾ Center for Infection and Immunity, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁽²⁾ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Ubiquitination plays very important roles in regulating protein degradation and transportation. Many RING finger proteins act as E3 ligase in these processes. A new type I transmembrane protein with unknown function, named RNF148 was studied. A RFP -IRES- TSPANs-EGFP/pCI vector was constructed to screen the substrate of RNF148. By using FACS, co-IP and confocal test, RNF148 was identified to interact with TSPAN15 which belongs to a tetraspanin family. RNF148 could down-regulate TSPAN15 by its E3 ligase activity. The RING domain of RNF148 was a key structure of its ubiquitin-ligase activity and was required for the poly-ubiquitination of TSPAN15. The mutation of Lys-21 and Lys-278 to arginine in the cytosolic fragment of TSPAN15 led to low ubiquitination density compared with the wild-type. RNF148-mediated ubiquitination promoted proteasomal degradation and downregulation of TSPAN15 *via* Lys-29 linkages. RNF148 also ubiquitinated TSPAN15 *via* generating Lys-63 polymerize ubiquitin molecules. These findings demonstrate for the first time that RNF148 is a RING finger ubiquitin E3 ligase and TSPAN15 is one of its substrates.

Key words RNF148, TSPAN15, E3 ligase, ubiquitin, tetraspanin

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00053

*This work was supported by a grant from National Major Science and Technology Special Project of China(2008ZX10002-008).

**Corresponding author.

Tel: 001-408-6097577, E-mail: jtang@ibp.ac.cn

Received: February 1, 2013 Accepted: March 12, 2013