

类泛素蛋白 ISG15 及其在先天免疫中的作用*

刘畅¹⁾ 乔文涛¹⁾ 王琛²⁾ 耿运琪^{1)**}

(¹⁾南开大学生命科学学院, 天津 300071;

²⁾中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 病毒感染和干扰素刺激高等动物细胞, 均可以强烈地诱导表达干扰素刺激基因 15 编码的蛋白 ISG15, 它是最早发现的类泛素修饰蛋白. 虽然针对泛素及其修饰功能已进行了广泛而深入地研究, 但对于 ISG15 共价修饰以及它的生物学功能了解甚少, 有待进一步探讨. 该领域的研究近几年有所突破, 发现了有关 ISG15 修饰的酶系统, ISG15 及其修饰系统在先天免疫以及干扰素信号调节中的重要作用. 简要介绍 ISG15 的发现历史、生化性质、基因调控特点以及 ISG15 修饰系统中所涉及的酶, 总结目前研究 ISG15 及其修饰与调节先天性免疫相关过程的一些最新进展.

关键词 ISG15, 类泛素修饰, 先天免疫, 干扰素调节

学科分类号 Q26, Q939.91

在漫长的进化过程中, 脊椎动物形成了一套复杂的先天性和获得性免疫系统, 担当诸如特定病原体的识别、生成抗体及针对特定抗原的细胞毒性 T 细胞等功能. 先天性免疫系统是机体对病毒和细菌感染的第一道防线, 主要通过诱导表达一系列特异的细胞因子来控制感染, 同时启动获得性免疫反应. ISG15 蛋白由干扰素刺激基因 15 (interferon-stimulated gene 15, *isg15*) 编码, 在病毒或 I 型干扰素的刺激下, 强烈地诱导表达. 与泛素相似, ISG15 可以对蛋白质进行共价修饰, 但并不介导蛋白质的降解. 目前认为蛋白质的 ISG15 共价修饰主要参与机体的先天免疫和干扰素作用过程的调节. 研究发现, ISG15 以及蛋白质的 ISG15 共价修饰对刺激细胞增殖、增强细胞毒作用、促进白细胞趋化作用等先天免疫功能以及在干扰素调控的过程中有着重要的作用. 对 ISG15 及其修饰功能的研究, 以及病毒细菌感染对 ISG15 表达和蛋白质 ISG15 修饰水平影响的研究, 将有助于我们更加全面地理解免疫过程, 了解感染过程中病毒、细菌与宿主之间相互作用的关系.

1 ISG15 蛋白的发现

1979年, Farrell 等^[1]首先发现干扰素可以诱导一种 15 ku 蛋白质的表达. 该发现当时并没有引起

重视, 直到 1984 年, Korant 等^[2]发现, 使用干扰素(interferon, IFN)处理人和牛的细胞系, 可以诱导表达一种分子质量 15 ku 的蛋白质. 该诱导表达依赖细胞的 RNA 合成, 并且干扰素- α (interferon- α , IFN- α) 和干扰素- β (interferon- β , IFN- β) 比干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 更加有效地诱导该蛋白质的表达. 1986 年 Blomstrom 等^[3]在 Daudi 细胞中克隆获得人类 ISG15 的 cDNA, 最初所测定的序列中包括一个额外的核苷酸, 因此导致终止密码子的提前, 巧合的是由该序列所推测的翻译产物计算所得分子质量大约为 15 ku, 与先前实验测定的分子质量一致, 因此将该基因命名为干扰素刺激基因 15 (interferon-stimulated gene 15, *isg15*), 编码蛋白为 ISG15. 1987 年, ISG15 的 cDNA 被再次克隆, 它所编码的氨基酸序列实际包含 165 个氨基酸残基, 通过计算所得分子质量为 17.89 ku^[4]. 而后一年, 发现这种全长 165 氨基酸残基的蛋白质是成熟 ISG15 蛋白的前体形式. C 端的 8 个氨基酸残基从 ISG15 前体上移除, 使 C 端的氨

*国家重点基础研究发展计划(973)(2005CB522903)和国家自然科学基金(30470071)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel/Fax: 022-23501783, E-mail: gengyq@nankai.edu.cn

收稿日期: 2006-07-07, 接受日期: 2006-08-30

基 酸 序 列 为 “Leu Arg Leu Arg Gly Gly” (LRLRGG)^[9], 该 C 端序列恰好是泛素或类泛素蛋白进行共价修饰的活性位点. 通常, 泛素或类泛素蛋白正是通过翻译为带有 C 端延伸的前体形式, 阻止它们与修饰蛋白的直接结合. 另外 ISG15 的成熟形式缺少 N 端的甲硫氨酸, 计算所得分子质量为 17.145 ku. 实际上这种最初被认为是 15 ku 的蛋白质分子质量应为 17 ku.

2 ISG15 蛋白的结构与生化特点

ISG15 属于类泛素蛋白(ubiquitin like protein, Ubls). 类泛素蛋白是一类小分子蛋白质, 它们不仅在结构上与泛素相似, 而且也可以共价连接到其他的蛋白质上对其进行共价修饰^[9]. ISG15 可以与泛素的抗体发生交叉反应, 因此也被称为泛素交叉反应蛋白(ubiquitin cross-reaction protein, UCRP)^[9]. 通过蛋白质序列分析, 发现 ISG15 含有 2 个功能域, 其中 N 端功能域与泛素有 33% 的同源性, C 端功能域与泛素有 32% 的同源性. 目前已解析 ISG15 蛋白的晶体结构, 发现它具有 2 个泛素同源的折叠(ubiquitin fold), 使我们对 ISG15 的 2 个功能域如何进行连接有了初步了解^[7]. 与泛素或其他的类泛素蛋白(ubls)相似, ISG15 首先被翻译为前体蛋白形式, 而后通过蛋白酶加工成为成熟形式, 加工后 ISG15 C 端 2 个相连的甘氨酸对于其共价修饰作用是必需的^[7]. 而与泛素或其他的类泛素蛋白不同, ISG15 目前尚未在酵母、线虫、昆虫以及植物等低等生物中发现, 只存在于脊椎动物. ISG15 最初在人类细胞中被发现, 而后发现在小鼠、大鼠、牛和羊中均有表达. ISG15 在目前所报道的 5 种哺乳动物中, 氨基酸序列只有 47% 的保守性. 相比较泛素跨物种间几乎 100% 的保守性, ISG15 跨物种的保守性较低.

3 与 ISG15 共价修饰有关的酶系统

蛋白质的 ISG15 共价修饰与蛋白泛素化修饰类似, 主要涉及 3 个修饰酶, 分别是: 激活酶 E1、结合酶 E2 和连接酶 E3^[8]. 对于泛素修饰酶系统, E1 分子具有保守的 ATP 结合区域和活化位点——半胱氨酸残基, 它们对活化底物是必需的. E1 激活泛素需要 ATP, 首先乙酰化泛素的 C 端, 而后在泛素的 C 端和 E1 的半胱氨酸残基之间形成硫脂键. 被激活的泛素而后转移到 E2 酶激活的半胱氨酸残基上, 激活的泛素与 E2 分子之间形成硫酯键. 最

后在 E3 连接酶的帮助下, 激活的泛素转移到底物的赖氨酸残基上, 完成蛋白质的泛素化修饰. 此外, 泛素去结合酶(deubiquitinating enzyme, Dubs)在泛素的循环使用中有重要的作用. Dubs 在新合成的泛素加工中也有重要的作用, 可以将新合成的泛素前体加工为成熟形式. 类比泛素修饰酶系统, ISG15 共价修饰酶系统同样含有激活酶 E1、结合酶 E2、连接酶 E3 以及去结合酶. 近几年, 对它们的研究取得了较大的进展.

3.1 ISG15 激活酶 E1——UBE1L

1993 年, Kok 等^[9]从人的 B 细胞文库中克隆得到 ube1l (ubiquitin-activating enzyme E1-like, ube1l). ube1l 基因距染色体 3p21 的 D3F15S2 基因座 140 kb. 其编码的 UBE1L 与泛素 E1 具有显著的同源性, 具有 45% 的氨基酸同源性以及一个保守的半胱氨酸活化位点^[9]. 2001 年, UBE1L 被证实是 ISG15 的激活酶 E1^[10]. 通过酵母双杂交系统, 发现流感病毒 B 的蛋白 NS1B 可以与 ISG15 相互作用. NS1B 与 ISG15 结合, 可以进一步阻断 ISG15 的共价修饰^[10]. 实验中, 使用 GST-ISG15 融合蛋白证实 UBE1L 与 ISG15 相互作用. UBE1L 可以与放射性的 ISG15 形成连接体, 并且催化激活 ISG15, 可作为 ISG15 的激活酶 E1. 而泛素的激活酶 E1 不能代替 UBE1L 对蛋白质进行 ISG15 结合修饰. 干扰素的处理可以上调 ube1l 的表达. Knight 等^[11]发现, ube1l 基因的上游调控序列含有一个保守的干扰素刺激应答元件 / 干扰素反应结合位点(ISRE/IRFE 结合位点), 使得在干扰素的处理后 UBE1L 表达上调. 目前已经知道, ube1l 是一种干扰素调节基因, 其基因产物在 ISG15 结合过程中行使 E1 功能.

3.2 ISG15 结合酶 E2——UBC8

Zhao 和 Kim 两个研究小组通过不同的方法独立地证明了泛素结合酶 8(ubiquitin conjugating enzyme 8, UBC8) 是 ISG15 的结合酶 E2. 在激活酶 E1 和 ATP 的存在时, 泛素可以与结合酶 E2 形成硫脂键, 因此假设在相似条件下 ISG15 也可以与自身的 E2 形成硫脂键. Zhao 等^[12]使用干扰素刺激处理的细胞, 将裂解液进行 GST-ISG15 免疫共沉淀实验, 鉴定其中与 ISG15 共价连接的蛋白质. 通过这种方法, 他们发现 UBC 8 可以与 ISG15 共价连接, 通过实验进一步证实 UBC8 就是 ISG15 的结合酶 E2. Kim 等^[13]首先基于 ISG15 激活酶 UBE1L 和泛素激活酶 UBE1 的高度同源性, 以及 ISG15 去结合酶 43(ubiquitin specific protease 43,

UBP43)与泛素去结合酶的高度同源性, 假设 ISG15 的 E2 可能是已经确定泛素系统的 E2, 由于 UBE1L 和 UBP43 的表达均可被干扰素诱导, 因此, 很自然地假设该 E2 也可以被干扰素诱导表达. 他们通过筛选符合条件的蛋白质最后确定 UBC8 为 ISG15 的结合酶 E2.

3.3 ISG15 的连接酶 E3——EFP、Herc5

Zou 等^[14]发现了第一种可能的 ISG15 连接酶 E3——雌激素反应指蛋白 (Estrogen-responsive finger protein, EFP). 与其他已知的蛋白质 ISG15 结合修饰系统的成员——ISG15、UBE1L、UBP43 以及 UBC8 一样, EFP 也是一种干扰素诱导表达蛋白, 作为 14-3-3 蛋白 ISG15 修饰过程中的连接酶 E3. 对 EFP 的表达进行 siRNA 干扰可以减少细胞内 14-3-3 蛋白的 ISG15 共价修饰. EFP 的 ISG15 共价修饰的活性依赖其 RING 区域. 此外, Dastur 等^[15]使用蛋白质组学的方法鉴定了被 ISG15 共价修饰的 158 个人类靶蛋白, 其中包括 ISG15 的 E1、E2 和一种泛素 HECT 类型的 E3——Herc5. Herc5 同样可以被 IFN- β 诱导, 说明 Herc5 可能属于 ISG15 共价修饰酶系统. 对 Herc5 进行 RNA 干扰,

可以使体内大量 ISG15 靶蛋白的 ISG15 共价修饰消除, 可见 Herc5 对于细胞内广谱蛋白质的 ISG15 共价修饰是必要的. 在没有使用干扰素处理的细胞中, 共转染表达 ISG15、Ube1L、UbcH8 和 Herc5 的表达质粒可以导致 ISG15 共价修饰的显著提高. Herc5 上的一个半胱氨酸位点与 RCC1 重复区域对它的活性是必需的.

3.4 ISG15 去结合酶——UBP43

UBP43 具有 UBP(ubiquitin specific protease)酶家族的特征, UBP 蛋白酶家族成员参与将连接于蛋白质上的泛素移除的过程. 使用 ¹²⁵I 标记的泛素或类泛素修饰融合肽, 其中包括泛素 -gsPESTc、SUMO-gsPETc、Nedd8-gsPETc 和 ISG15-gsPESTc, 证实 UBP43 优先从 ISG15-gsPESTc 连接体上移除 ISG15. 使用表达 UBP43 的细胞实验进一步确定 UBP43 是一种 ISG15 特异的去结合酶^[16]. UBP43 是目前所知唯一的 ISG15 去结合酶, 但并不排除存在其他 ISG15 去结合酶的可能. 目前已经获得缺失 UBP43 的小鼠, 来自这些小鼠的 UBP43 缺陷细胞表现出较高的 ISG15 蛋白共价修饰的基础水平, 并且在干扰素刺激下可以诱导更高的 ISG15 蛋白

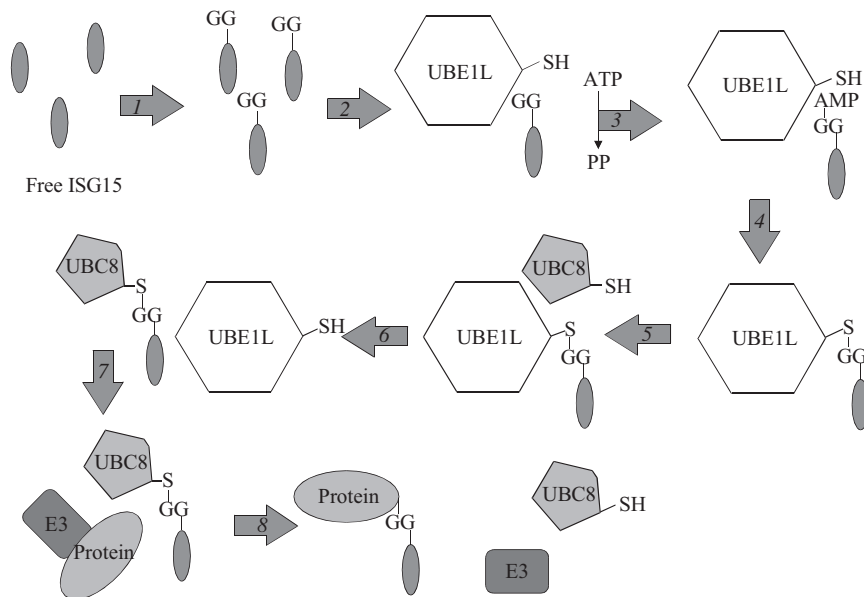


Fig. 1 Schematic diagram of the ISG15 conjugation system

图 1 ISG15 结合修饰系统示意图

1: ISG15 被加工, 释放出 C 端 2 个连续的甘氨酸. 2: E1-UBE1L 靠近加工好的 ISG15. 3: 通过 E1, ISG15 C 端的羧基腺苷酸化, ISG15 被激活. 4: E1 上的硫醇攻击 AMP-羧基, 与 ISG15 形成硫酯键. 5: E2-UBC8 靠近携带 ISG15 的 E1 分子. 6: 通过转酯作用, ISG15 转到 E2 分子上, E1 分子被释放. 7: 携带靶蛋白的 E3 分子与携带 ISG15 的 E2 分子相互靠近. 8: E2 与 E3 分子相互作用, ISG15 连接到靶蛋白分子上, E2 与 E3 分子被释放.

共价修饰水平, 而蛋白质的泛素化水平并没明显改变^[17]. 这就进一步确定 UBP43 是一种特异的 ISG15 去结合蛋白酶.

ISG15 对蛋白质的共价修饰过程与蛋白质的泛素化修饰过程类似(图 1), 而且参与 2 种修饰过程中的酶具有高度的同源性, 有些甚至在两种修饰过程中均能行使功能, 说明蛋白质的 ISG15 修饰系统与蛋白质的泛素修饰系统之间在进化上有着密切的关系. 但与泛素修饰系统不同, ISG15 修饰系统成员的表达均可被干扰素强烈诱导, 暗示蛋白质的 ISG15 共价修饰在免疫过程中可能有重要作用.

4 ISG15 表达的调节

编码 ISG15 的基因 *isg15* 为干扰素刺激基因, 其启动子含有 2 个 ISRE/IRFE 结合位点, 可以通过干扰素通路激活(图 2-1). 在干扰素刺激下, 2 h 后可以检测到 ISG15, 18 h 后达到峰值^[18]. 干扰素信号通路激活起始于干扰素结合细胞表面上的干扰素受体. I 型干扰素的受体是由 IFNAR(interferon alpha/beta receptor)1 和 2 组成的异源二聚体, 当与干扰素结合后, 它们组装并激活下游激酶. 此时, Janus 激酶 1 (Janus tyrosine kinase 1, JAK1) 和蛋白酪氨酸激酶 2 (tyrosine kinase 2, TYK2) 被磷酸化激活, 随后磷酸化下游的信号转导转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 1 和 2. STAT1 和 STAT2 被 JAK1 磷酸化后, 进行 STAT 异源分子二聚化. 磷酸化的 STAT1 和 STAT2 以及干扰素调节因子 9 (interferon regulatory factor 9, IRF9) 形成复合物. 该复合物进入细胞核, 结合位于干扰素刺激基因上游的 ISRE/IRFE 的位点, 从而激活下游基因的表达^[19].

ISG15 的表达同时受干扰素调节因子(IRF)的调节(图 2-2). ISG15 是最早被报道的受 IRF3 调节的蛋白质之一. IRF3 蛋白分子质量 55 ku, 在所有的组织中组成型表达. 病毒感染以及干扰素处理并不刺激 IRF3 的表达, 然而, 病毒感染可以磷酸化并激活 IRF3. 磷酸化后的 IRF3 进入细胞核, 而后结合在 ISRE/IRFE 元件上激活下游干扰素刺激基因的表达^[20]. 另外 ISG15 的启动子含有一个 PU.1 的结合位点, 该位点与 ISRE/IRFE 的序列重叠. PU.1 是 Ets 转录因子家族的一员, 由 B 细胞和骨髓特异细胞表达, 在造血作用中有重要的作用. 有报道 PU.1 可以与 IRF4 或 IRF8 协同激活 *isg15* 的启动子^[21]

(图 2-3).

在细菌和病毒感染细胞或其他外界因素刺激细胞时, ISG15 的表达会上升. 这些条件可能通过激活 IRF3 和 ISGF3 转录因子进而激活 ISG15 的表达. 使用伽马射线处理直肠癌细胞系 HCT116, 急性的多重硬化症损伤细胞, 使用抗癌药物喜树碱 (CPT, 拓扑异构酶 I 抑制剂) 处理直肠和乳腺癌细胞, 毛细血管扩张紊乱病人的成纤维细胞, 组成性激活 JNK1 β 表达的小鼠成纤维细胞, 以及过表达 I-309 的 T 细胞中, ISG15 的表达均有增加^[22~27]. ISG15 在这些细胞应急中的作用目前还不明确. 有可能这些细胞应急诱导干扰素的分泌, 从而增加 ISG15 的表达水平.

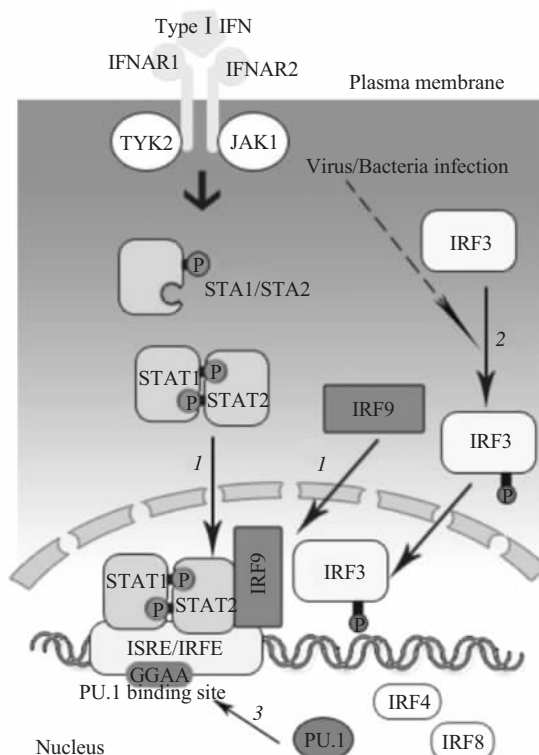


Fig. 2 Regulation of ISG15 expression

图 2 ISG15 表达的调节

1: I 型干扰素结合到细胞膜上的干扰素受体, 激活 TYK2 与 JAK1, 磷酸化 STAT1 与 STAT2, STAT1 与 STAT2 形成二聚体, 与 IRF9 形成复合物, 进入细胞核结合在 ISRE/IRFE 元件上, 激活下游 *isg15* 基因的表达. 2: 病毒细菌感染等多种因素, 引起 IRF3 的磷酸化, 磷酸化后的 IRF3 进入细胞核, 通过 ISRE/IRFE 元件激活 *isg15* 基因的表达. 3: PU.1 协同 IRF4 与 IRF8 通过 *isg15* 基因上游的 PU.1 结合位点激活 *isg15* 基因的表达.

5 ISG15 以及 ISG15 化修饰在免疫过程中的作用

ISG15 的表达与干扰素的密切关系, 暗示它在免疫中有着重要的作用. 细胞外自由 ISG15 具有细胞因子的活性, 参与某些细胞免疫的调节. 细胞内 ISG15 共价修饰的明确生物学功能目前还没有得到公认. ISG15 共价修饰可能在脊椎动物生物学中有重要的作用. ISG15 以及其修饰酶系统的表达调控与干扰素的密切关系, 说明 ISG15 共价修饰系统在先天免疫中有着重要的作用.

5.1 细胞外 ISG15 的作用

有报道细胞外游离 ISG15 具有细胞因子的活性. 由 *E. coli* 表达的重组 ISG15 可刺激 CD3⁺ 细胞产生 IFN- γ , 但不能刺激来自人外周血的 CD14⁺ 或 CD56⁺ 细胞产生 IFN- γ ^[28]. 重组 ISG15 可以刺激自然杀伤细胞(NK)增殖并提高 NK 细胞的细胞毒作用. 在这一过程中, CD3⁺T 细胞对于 ISG15 诱导的增殖和 NK 细胞的细胞毒作用是必需的. 并且细胞外游离 ISG15 的细胞因子作用具有物种特异性.

人外周血细胞(PBMCs)可以释放 ISG15^[28], 释放的 ISG15 对于 Daudi、U937 或 HL60 细胞生长没有明显的作用. 然而, 当与新鲜的 PBMCs 共同培养, ISG15 可以加强由脂多糖(LPS)诱导的针对 WEHI-164 靶细胞单核细胞的细胞毒作用. 兔抗 ISG15 的多克隆抗体可抑制这种加强作用, 抗 TNF- α 的中和抗体也可消除该作用. 这说明由 ISG15 介导的细胞毒作用的提高可能是通过 TNF- α 起作用的.

细胞外 ISG15 还是一种特殊的中性粒细胞的趋化因子. 中性粒细胞是人体中最多的外周血白细胞, 对感染的部位最先作出应答. 在实验中, 从约氏疟原虫 (*Plasmodium yoelii*) 感染的红细胞中分离到了一种特殊的中性粒细胞趋化因子, 最终确定这种因子为 ISG15^[29].

5.2 细胞内 ISG15 的作用

5.2.1 在调节干扰素信号通路中的作用. 目前已经获得缺失 ISG15 特异性去结合蛋白酶 UBP43 的小鼠动物模型, 从而使我们对 ISG15 共价修饰在干扰素信号通路中的调节作用有了间接的了解. 在缺失 ISG15 特异的去结合蛋白酶 UBP43 的小鼠中, 干扰素信号调节表现不正常^[30]. 来自 ubp43^{-/-}小鼠的细胞对于 I 型干扰素的刺激超敏感. 来自 ubp43^{-/-}小鼠的骨髓细胞在干扰素的刺激下进行细胞凋亡. 这

种缺失 UBP43 的细胞存在增加和持续的 STAT1 磷酸化, 同样会提高 ISGF3 的 DNA 结合能力以及干扰素刺激基因的表达水平^[30]. 在缺失 UBP43 的细胞中可观察到上调和持续的干扰素信号事件. 这些事件有可能与 ISG15 结合修饰增强有关, 但还需进一步证明. I 型干扰素两个关键的元件 JAK1 和 STAT1, 在干扰素的刺激下被修饰, 由于它们本身可以被 ISG15 共价修饰, 因此很容易将它们的 ISG15 共价修饰与 UBP43 缺失的细胞对干扰素的高敏感相互联系, 然而目前还没有直接的证据支持这一假设. 对 UBP43 缺失的细胞使用干扰素进行刺激, 可以观测到 STAT1 磷酸化的增加, 但并没有观测到它自身 ISG15 共价修饰水平的增加. JAK1 和 STAT1 的 ISG15 共价修饰有可能与 UBP43 缺失细胞中增强的干扰素信号事件并没有直接的关系. 可见, UBP43 缺失导致的干扰素信号通路增强与它导致的蛋白质 ISG15 共价修饰增加之间存在着极其复杂的关系.

5.2.2 在先天免疫和抗病毒、抗细菌感染中的作用.

I 型干扰素强烈地激活 ISG15 的产生和 ISG15 共价修饰的形成. Kunzi 和 Pitha 报道^[31], IFN- ω 较 IFN- α 2 可以更强烈地诱导人 PBMC 中 ISG15 的表达, 而且 IFN- ω 较 IFN- α 2 更加有效地阻止人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的复制. 因此, 他们研究 ISG15 是否对 HIV 的复制有一些作用: 在表达 ISG15 的质粒存在或不存在的条件下, 将 NL4-3 HIV-1 原病毒 DNA 转染进入 CEM X 174 人成淋巴细胞系, 转染 48 h 后, 收集细胞核和细胞质的 RNA. RNA 印迹分析在转染 ISG15 表达质粒的细胞中, 核内 9.2 knt HIV-1 RNA 的信号显著地增加, 而细胞质中包括 9.2 knt 的非剪切形式以及 4.2 knt 和 2.0 knt 成熟形式的 HIV-1 RNA 减少^[31]. 这是有关 ISG15 的细胞抗病毒作用第一篇报道.

Okumura 等^[32]发现, ISG15 可以抑制 HIV-1 病毒的释放, 而对细胞内 HIV-1 蛋白质的合成没有影响. ISG15 表达特异地抑制 Gag 和 Tsg101 蛋白的泛素化, 破坏 Gag 的 L 区域与 Tsg101 的相互作用, 但并没有检测到 Gag 或 Tsg101 的 ISG15 共价修饰. 在使用干扰素处理的细胞中, 同样可以观测到 Gag-Tsg101 相互作用的抑制, 而该抑制可以通过 ISG15 的 RNA 干扰消除. 这些结果说明, ISG15 在干扰素所介导的对 HIV-1 晚期包装释放抑制中的重要作用.

敲除 UBP43 的小鼠的 MEF 细胞表现出对 Sindbis 病毒抗性的增高. 感染 Sindbis 病毒 30 h 后, 并没有观测到野生型和 UBP43 敲除小鼠 MEF 细胞中病毒滴度的差异. 而感染 4 天后, ubp43^{-/-}小鼠显著地表现较低的病毒滴度. UBP43 敲除的小鼠只需较少的干扰素就可以抑制病毒的复制^[33].

在 A549 细胞中, 流感病毒 A (influenza A virus) 通过阻断干扰素途径, 不激活 ISG15 的合成. 而流感病毒 B (influenza B virus) 在感染后可以引起 ISG15 水平的上升. 尽管 ISG15 有表达, 但它对蛋白质的共价修饰却被流感病毒 B 的 NS1B 蛋白所阻断. NS1B 蛋白可与 ISG15 蛋白直接相互作用, 从而阻止了 ISG15 与 E1 激活酶 UBE1L 的结合, 导致流感病毒 B 感染后胞内 ISG15 蛋白共价修饰不足. 流感病毒对 ISG15 共价修饰系统的调节从侧面证明 ISG15 共价修饰具有抗病毒的作用^[10].

6 结语与展望

蛋白质的翻译后修饰是调节蛋白质功能多样性的重要手段之一. 其中, 泛素尤其是类泛素修饰是最近几年中兴起的研究热点. ISG15 是一种类泛素小蛋白, 与泛素相似, ISG15 可以对蛋白质进行共价结合修饰. 与泛素不同的是, ISG15 只存在于脊椎动物中, 且其表达可以通过干扰素诱导. 这些特点决定了, ISG15 既具有与泛素类似的共价结合修饰酶系统, 又与脊椎动物先天免疫的调节存在密切关系. 目前, 对 ISG15 的共价结合修饰酶系统以及其对蛋白质共价结合修饰功能的研究尚处于初期, 仅仅涉及 ISG15 功能的冰山一角, 还有许多有趣但是尚未解答的问题. 例如, 被 ISG15 修饰的靶目标蛋白还有哪些? ISG15 的靶蛋白是否可区分特定的家族或类别? 与 Nedd8 修饰 cullin 家族相比, ISG15 是否修饰一套特定的蛋白质? ISG15 修饰蛋白质的半衰期将如何变化, 是增加还是减少所修饰蛋白质的半衰期? ISG15 共价修饰与细胞骨架定位有什么关系? 目前, 已经获得缺失 ISG15 特异的去结合蛋白酶 UBP43 的小鼠, 而 ISG15 敲除的小鼠和 UBE1L 敲除的小鼠还没有进行深入的表型分析. 对这些动物模型或细胞模型的获得和研究, 将可能最终揭示 ISG15 和 ISG15 共价修饰的生物学功能. 我们实验室长期致力于慢病毒的研究, 而对慢病毒与 ISG15 表达的关系研究尚属空白, 目前我们正对该方面展开研究, 希望获得有意义的研究成果, 帮助我们认识蛋白质类泛素化修饰与免疫缺

陷间的关系. 同时, 对 ISG15 的研究无疑将有助于我们更好地理解脊椎动物的免疫调节, 具有重要的理论意义和潜在的应用价值.

参考文献

- Farrell P J, Broeze R J, Lengyel P. Accumulation of an mRNA and protein in interferon-treated Ehrlich ascites tumour cells. *Nature*, 1979, **279** (5713): 523~525
- Korant B D, Blomstrom D C, Jonak G J, *et al.* Interferon-induced proteins. Purification and characterization of a 15 000-dalton protein from human and bovine cells induced by interferon. *J Biol Chem*, 1984, **259** (23): 14835~14839
- Blomstrom D C, Fahey D, Kutny R, *et al.* Molecular characterization of the interferon-induced 15-kDa protein. Molecular cloning and nucleotide and amino acid sequence. *J Biol Chem*, 1986, **261**(19): 8811~8816
- Reich N, Evans B, Levy D, *et al.* Interferon-induced transcription of a gene encoding a 15-kDa protein depends on an upstream enhancer element. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84** (18): 6394~6398
- Knight E Jr, Fahey D, Cordova B, *et al.* A 15-kDa interferon-induced protein is derived by COOH-terminal processing of a 17-kDa precursor. *J Biol Chem*, 1988, **263** (10): 4520~4522
- Haas A L, Ahrens P, Bright P M, *et al.* Interferon induces a 15-kilodalton protein exhibiting marked homology to ubiquitin. *J Biol Chem*, 1987, **262** (23): 11315~11323
- Narasimhan J, Wang M, Fu Z, *et al.* Crystal structure of the interferon-induced ubiquitin-like protein ISG15. *J Biol Chem*, 2005, **280** (29): 27356~27365
- Pickart C M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 2001, **70**: 503~533
- Kok K, Hofstra R, Pilz A, *et al.* A gene in the chromosomal region 3p21 with greatly reduced expression in lung cancer is similar to the gene for ubiquitin-activating enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (13): 6071~6075
- Yuan W, Krug R M. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *Embo J*, 2001, **20** (3): 362~371
- Knight E Jr., Cordova B. IFN-induced 15-kDa protein is released from human lymphocytes and monocytes. *J Immunol*, 1991, **146** (7): 2280~2284
- Zhao C, Beaudenon S L, Kelley M L, *et al.* The UbcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN-alpha/beta-induced ubiquitin-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (20): 7578~7582
- Kim K I, Giannakopoulos N V, Virgin H W, *et al.* Interferon-inducible ubiquitin E2, Ubc8, is a conjugating enzyme for protein ISGylation. *Mol Cell Biol*, 2004, **24** (21): 9592~9600
- Zou W, Zhang D E. The interferon-inducible ubiquitin-protein isopeptide ligase (E3) EFP also functions as an ISG15 E3 ligase. *J Biol Chem*, 2006, **281** (7): 3989~3994
- Dastur A, Beaudenon S, Kelley M, *et al.* Herc5, an interferon-induced HECT E3 enzyme, is required for conjugation of ISG15 in human cells. *J Biol Chem*, 2006, **281** (7): 4334~4338
- Malakhov M P, Malakhova O A, Kim K I, *et al.* UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins. *J Biol Chem*, 2002, **277** (12): 9976~9981

- 17 Ritchie K J, Malakhov M P, Hetherington C J, *et al.* Dysregulation of protein modification by ISG15 results in brain cell injury. *Genes Dev*, 2002, **16** (17): 2207~2212
- 18 Loeb K R, Haas A L. The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. *J Biol Chem*, 1992, **267** (11): 7806~7813
- 19 Tanaka N, Taniguchi T. The interferon regulatory factors and oncogenesis. *Semin Cancer Biol*, 2000, **10** (2): 73~81
- 20 Hiscott J, Pitha P, Genin P, *et al.* Triggering the interferon response: the role of IRF-3 transcription factor. *J Interferon Cytokine Res*, 1999, **19** (1): 1~13
- 21 Meraro D, Gleit-Kielmanowicz M, Hauser H, *et al.* IFN-stimulated gene 15 is synergistically activated through interactions between the myelocyte/lymphocyte-specific transcription factors, PU.1, IFN regulatory factor-8/IFN consensus sequence binding protein, and IFN regulatory factor-4: characterization of a new subtype of IFN-stimulated response element. *J Immunol*, 2002, **168** (12): 6224~6231
- 22 Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, *et al.* 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell*, 1997, **1** (1): 3~11
- 23 Lock C, Hermans G, Pedotti R, *et al.* Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*, 2002, **8** (5): 500~508
- 24 Desai S D, Mao Y, Sun M, *et al.* Ubiquitin, SUMO-1, and UCRP in camptothecin sensitivity and resistance. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, **922**: 306~308
- 25 Siddoo-Atwal C, Haas A L, Rosin M P. Elevation of interferon beta-inducible proteins in ataxia telangiectasia cells. *Cancer Res*, 1996, **56** (3): 443~447
- 26 Han S Y, Kim S H, Heasley L E. Differential gene regulation by specific gain-of-function JNK1 proteins expressed in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*, 2002, **277** (49): 47167~47174
- 27 Ruckes T, Saul D, Van Snick J, *et al.* Autocrine antiapoptotic stimulation of cultured adult T-cell leukemia cells by overexpression of the chemokine I-309. *Blood*, 2001, **98** (4): 1150~1159
- 28 Recht M, Borden E C, Knight E Jr. A human 15-kDa IFN-induced protein induces the secretion of IFN-gamma. *J Immunol*, 1991, **147** (8): 2617~2623
- 29 Owhashi M, Taoka Y, Ishii K, *et al.* Identification of a ubiquitin family protein as a novel neutrophil chemotactic factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **309** (3): 533~539
- 30 Malakhova O A, Yan M, Malakhov M P, *et al.* Protein ISGylation modulates the JAK-STAT signaling pathway. *Genes Dev*, 2003, **17** (4): 455~460
- 31 Kunzi M S, Pitha P M. Role of interferon-stimulated gene ISG-15 in the interferon-omega-mediated inhibition of human immunodeficiency virus replication. *J Interferon Cytokine Res*, 1996, **16** (11): 919~927
- 32 Okumura A, Lu G, Pitha-Rowe I, *et al.* Innate antiviral response targets HIV-1 release by the induction of ubiquitin-like protein ISG15. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103** (5): 1440~1445
- 33 Ritchie K J, Hahn C S, Kim K I, *et al.* Role of ISG15 protease UBP43 (USP18) in innate immunity to viral infection. *Nat Med*, 2004, **10** (12): 1374~1378

Ubiquitin-like Protein ISG15 and Its Role in Innate Immunity*

LIU Chang¹⁾, QIAO Wen-Tao¹⁾, WANG Chen²⁾, GENG Yun-Qi¹⁾**

⁽¹⁾ College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China;

⁽²⁾ Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute for Biological Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Virus infection or interferon can stimulate robust expression of the protein ISG15 that is encoded by interferon stimulated gene 15, which was the first ubiquitin-like molecule identified two decades ago. While ubiquitin and its many important functions have been well established, the functions of ISG15 and its post-translational conjugation are still largely unknown. Recently, some specific enzymes have been identified to be involved in the ISG15 modification system, suggests that ISG15 and its modification system play important roles in the innate immune response and regulation of interferon signaling. The history of ISG15 discovery and its biochemical characterization were briefly introduced. Then such topics as the ISG15 gene expression and the ISG15 modification will be focused on, and finally summarize new findings which have implications for ISG15 and its modification system in immunology and interferon signal transduction were summarized.

Key words ISG15, ubiquitin-like modification, innate immunity, interferon regulation

*This work was supported by grants from The National Basic Research Program of China (2005CB522903) and The National Natural Science Foundation of China (30470071).

**Corresponding author. Tel/Fax: 86-22-23501783, E-mail: gengyq@nankai.edu.cn

Received: July 7, 2006 Accepted: August 30, 2006