

Ubiquitin 及其功能的研究进展

文耕云 董燕麟

(第三军医大学生化教研室, 重庆 630038)

提 要

Ubiquitin 是广泛存在于真核细胞的热稳定多肽, 由 76 个氨基酸残基组成。Ubiquitin 在进化上显示出高度保守性。从酵母、植物到哺乳动物, 仅有 3 个氨基酸残基不同。它在介导细胞内蛋白质降解、转录的调节以及应激反应中发挥重要作用。文中主要对近年来在 ubiquitin 结构、基因及其功能方面的研究进展进行综述。

关键词 ubiquitin, 蛋白质降解, 热休克反应

1975 年, Goldstein^[1] 从胸腺中分离出一种多肽, 分子量约 8000dal, 它可以通过 β -肾上腺受体和腺苷酸环化酶的激活促进 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的分化。这种多肽后来发现存在于各种真核细胞, 且不同种属来源有着极其相似的结构^[2], 故名 ubiquitin, 又译作“泛肽”、“泛素”等。随着技术不断改进, ubiquitin 的作用也不断被发现, 逐渐为人们所重视。下面主要就其本质和生物学功能展开讨论。

1 Ubiquitin 的结构和基因

Ubiquitin 的一级结构已被阐明, 76 个氨基酸残基中大约有 24 个为疏水性, 形成稳定疏水核的基础。在 6, 11, 27, 29, 33, 48 和 63 位上为赖氨酸残基, 除 27 和 29 位上的 ϵ -氨基外, 其余都能被乙酰化。圆二色谱研究其二级结构表明, ubiquitin 主要是无规则卷曲, 只有 8% 的 α 螺旋, 但也有作者发现含 28% α 螺旋, 12% β 片层; ubiquitin 晶体 X 线衍射认为它有 3.5 圈 α 螺旋, 有混合 β -片层包括 4 股正向和 7 股反向转折。不同手段所获结果有较大差异, 可能为方法不成熟或条件不一致造成。在溶剂极性减小时, α 螺旋数增加, 这在 ubiquitin 与物质结合稳定性方面产生影响, 同时发现,

ubiquitin 代谢途径的改变^[3], 可由其构象改变造成。NMR 研究表明, ubiquitin 在 pH1—13 和低于 80°C 折叠成稳定的球状蛋白, 不易发生变性。

Ubiquitin 在进化上的保守性在其基因上可得到进一步证实。在酿酒酵母^[4] (*Saccharomyces cerevisiae*), 阐述了 4 种不同的 ubiquitin 编码基因, 即 UBI1, UBI2, UBI3, UBI4。按其功能可分为两类: 一类是多聚 ubiquitin 基因, 由 5 个重复编码基因组成, 其产物为聚合的 ubiquitin, 由 Gly-Met 连接。UBI4 属于此类。另一类为融合基因, 除表达产生 ubiquitin 外, 还有数十个氨基酸残基组成的序列连于其 C 端构成其尾部, 这一类有 UBI1, UBI2, UBI3。哺乳动物细胞的 ubiquitin 基因组成也与此相似。

切除以上 4 种基因中任一种, 细胞内游离 ubiquitin 含量仅轻微减少。一般地, 在细胞对数生长期^[5], 融合基因是 ubiquitin 的主要供给来源, 但即使这类基因全切除, 细胞生长所需的 ubiquitin 仍然可以通过 UBI4 供给。但在应激状况下, ubiquitin 的供给必须来源于 UBI4, 它

的重复编码基因表达所产生的多聚 ubiquitin, 较之于多个基因分别产生 ubiquitin 更为经济, 也更为迅速, 这样可以减少代谢的繁琐, 更好地适应应激过程。

融合基因表达所产生的 ubiquitin 尾部氨基酸序列, 在进化上也很保守, 人和酵母细胞的尾部氨基酸排列有 83% 的类同^[6]。酵母 UBI 1 和 UBI 2 表达的 ubiquitin 尾部均为 52 个氨基酸残基序列, UBI3 表达的 ubiquitin 尾部却为 76 氨基酸残基序列, 尽管所含氨基酸种类差异较大, 但碱性氨基酸残基占较大比例, 半胱氨酸含量也较为丰富, 同时发现有锌结合区域存在, 表明可能有与核酸结合的功能。用抗原标记示踪发现 UBI 1 和 UBI 2 所表达的 ubiquitin 尾部 52 氨基酸残基序列, 可出现在核糖体 60S 亚基上; 而 UBI3 所表达的 ubiquitin 尾部 76 氨基酸残基序列, 则出现在核糖体 40S 亚基上。蛋白质一级结构分析也证实, 核糖体蛋白可能与 ubiquitin 尾部氨基酸序列同源。推测^[7,8]真核细胞合成核糖体蛋白首先与 ubiquitin 连接, 这时 ubiquitin 化的蛋白似乎并不意味着降解, 具体原因尚不清楚, 相反, 由于核糖体蛋白寿命极短, 这种结合可防止其降解, 同时作为“楔子”, 将它载入核糖体。

2 Ubiquitin 介导的蛋白质降解

2.1 Ubiquitin 参与蛋白质降解的证据

Hershko^[9]等很早就发现, 网织红细胞里有一种热稳定的, 具有多肽性质的组分, 参与 ATP 依赖的血红蛋白降解, 他称此为 APF-1 (ATP-dependent proteolysis factor 1), 经测定发现, APF-1 就是 ubiquitin, 因而推断, 血红蛋白的降解是首先与 ubiquitin 结合。自此以后, ubiquitin 参与蛋白质降解的作用也渐被人们揭示出来。

为了直接获得证据, Rechsteiner^[10]等通过红细胞显微注射技术 (microinjection) 将标记的 ubiquitin 和氧化血红蛋白导入 Hela 细胞, 发现血红蛋白降解速度与 ubiquitin-Hb 形成速度呈正相关。Hershko^[11]等用 ubiquitin 抗

体从网织红细胞中分离 ubiquitin-蛋白复合物时也发现, 异常血红蛋白的降解产物随着 ubiquitin-蛋白复合物增多而增多。网柱菌属钙调蛋白 (*Dictyostelium calmodulin*) 的 119 位赖氨酸 ubiquitin 化后可被网织红细胞中胞浆提取液降解, 但当此赖氨酸甲基化后即不能与 ubiquitin 结合时, 网柱菌属钙调蛋白变得稳定了。

为什么 ubiquitin 与特定蛋白质结合时会加速或导致其降解呢? 第一, 它可能起一种信号的作用, 与蛋白质结合后被某种蛋白酶识别, 从而招致酶的水解; 第二, 它与蛋白质结合后, 引起了蛋白质分子构象的改变, 有利于被蛋白酶作用的基团暴露。Ubiquitin 与特定的蛋白质这种结合, 可能是复杂的细胞调节机制在蛋白质选择性降解中发挥作用的结果。总之通过 ubiquitin 化降解的蛋白质, 多为“短寿”和异常蛋白。

2.2 催化蛋白质与 ubiquitin 结合的反应过程及酶

目前认为, 在形成 ubiquitin 蛋白质复合物过程中有几个重要步骤: 1) 在 ATP 存在下, ubiquitin 激活酶 E₁ 催化 ubiquitin 羧基末端腺苷酸化, 然后这个激活的 ubiquitin 转移给 E₁, 与其末端半胱氨酸形成高能硫酯键相连。2) 在酶 E₁ 和 E₂ 催化下, ubiquitin 从 E₁ 转移给 E₂ 形成 E₂-ubiquitin。3) E₂-ubiquitin 中高能硫酯键是形成 ubiquitin-蛋白质复合物的动力, 当酶 E₃ 选择性与靶蛋白结合后, 又在 E₂ 和 E₃ 催化下, ubiquitin 再与靶蛋白结合, 随即靶蛋白被一种 ATP 依赖的蛋白水解酶降解, 据认为主要为 26S 蛋白酶复合物^[12]。

以上三种酶的电泳图谱提示^[13], 酵母和哺乳动物之间存在着相似性。E₁ 的分子量大约为 21 000 dal, 由大小相同的两个亚基组成。E₂ 也存在几种不同类型^[14], 迄今已有 7 种基因得到克隆, 但发现并非各种类型都在此过程中发挥作用。E₂ 的作用相当于一种载体。但催化 ubiquitin 与蛋白质结合过程中起中心作用的是 E₃, 它决定何种蛋白被降解从而与之结合。

何种形式的蛋白质才能被 E_3 识别呢? Hershko 认为,游离氨基末端的 $\alpha\text{-NH}_2$ 可被 E_3 识别,他发现珠蛋白和溶菌酶氨基末端的 $\alpha\text{-NH}_2$ 在 N^ϵ 乙酰化后比未乙酰化降解速度大幅度下降,但当加入多聚丙氨酸侧链,重新造成新的 $\alpha\text{-NH}_2$ 末端后,又可重新被降解。 ϵ -氨基似乎并无显著影响,当其被阻断后,降解速度仅略为下降。但是,如果氨基末端是蛋氨酸而又被氧化,与 E_3 结合能力大大加强,很快该蛋白就被水解掉。Bachmair 等制成一嵌合基因,编码与 β -半乳糖苷酶 N 端相链的酵母 ubiquitin,引入大肠杆菌中表达。Edman 降解发现,ubiquitin 的甘氨酸与 β -半乳糖苷酶的蛋氨酸相连。然后通过基因诱变将 19 种其他氨基酸分别取代蛋氨酸。发现 β -半乳糖苷酶的 N-端氨基酸残基不同,其半衰期从 2min 到 20h 不等。为此提出了 N 端法则,即在体蛋白半衰期的长短由其 N-末端氨基酸残基性质所决定。这似乎反映了 E_3 选择性与蛋白质结合后的必然结果。不过,如果仅仅由这种结合就决定何种蛋白质被降解,就难以解释被降解的多为“短寿”和异常蛋白质,同时被证实了有影响半衰期的蛋白质的理化性质、蛋白质的各级结构和构象等因素置于考虑之外,也缺乏足够说服力。

3 Ubiquitin-组蛋白复合物形成及意义

Calson^[15]等运用显微注射技术将 ubiquitin 导入 Hela 细胞,发现 42% 的 ubiquitin 与包括蛋白质在内的高分子物质 (HMW) 结合,促进其降解;还有 48% 的 ubiquitin 通常是游离的,有 10% 与染色体中组蛋白形成了复合物。

进一步研究发现,ubiquitin 通过其 C-末端的甘氨酸残基和组蛋白 H2A 的 119 位赖氨酸残基 ϵ -氨基形成肽键,催化过程与参与反应的酶与蛋白质 ubiquitin 化过程相似,但不发生降解,原因有待阐明。ubiquitin 化的 H2A, H2B 具有很高的转换率,几乎对其难以检测。推测其作用可能与转录有关。

最近发现 DNA 中的 A-T 丰富区段是转

录的重要功能调节区^[16],可能为一些基因启动子所在。有证据表明,只有在该区域内,与 ubiquitin 结合的 H2A,其亲和力才远远大于未结合的 H2A,这可能就是组蛋白 ubiquitin 化后影响 DNA 转录的机理之一。但对这方面的直接研究少见报道。

4 Ubiquitin 在热休克反应中的作用

当细胞在外界环境温度升高时,产生大量对机体有害的异常蛋白质,从大肠杆菌到人的组织细胞都有发生。在此以后,细胞又能诱导产生一组蛋白质,具有调整恢复细胞功能、抵御再次受到刺激的作用。这种现象叫热休克反应 (heat shock response),诱导产生的蛋白质叫热休克蛋白 (heat shock proteins HSPs)。实际上,缺氧、葡萄糖缺乏、亚硝酸盐等因素也能诱发这种反应,产生类似 HSPs 蛋白质。所以广义而论,这类蛋白应称为应激蛋白 (stress proteins) 更为合理。这是一个生理性应激反应,研究发现,ubiquitin 参与了这一过程。

有作者观察到^[17],细胞在 45℃ 孵育 5min,游离 ubiquitin 库和 ubiquitin 化的组蛋白迅速减少,而 ubiquitin-HMW 显著升高。这有何意义呢?

果蝇的 HSPs 基因启动子可与一特殊热休克转录因子结合而诱导转录。该因子在一般情况下 ubiquitin 化,以无活性形式存在于细胞中。当热休克发生后,由于大量异常蛋白聚集,“掳”走了游离库和与组蛋白结合的 ubiquitin,发生了前述该两类减少的现象,同时使热休克转录因子脱 ubiquitin 而具有活性,导致此因子与 HSPs 基因启动子结合,表达产生 HSPs。

另有作者提出^[18],ubiquitin 化的 H2A 减少,可能解除了对启动子的阻遏,也促进了 HSPs 基因的表达。

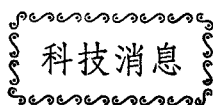
前面曾提到,应激情况下,UBI4 大量表达产生 ubiquitin,但随着异常蛋白质的降解,与 HMW 结合的 ubiquitin 减少,逐渐导致游离的 ubiquitin 水平上升,到一定程度时,热休克

转录因子再度 ubiquitin 化而失活, HSPs 产生减少, 恢复细胞原有状态。

目前对 ubiquitin 的研究处于初期上升阶段, 所以至今所认识到的只是其中一小部分。它的一些作用, 如在生长激素受体快速降解、血小板衍生生长因子受体功能及一些病理过程中, 还在不断挖掘, 难下结论。关于它本身的合成、调控和转运, 以及与作用物结合后的变构效应, 虽然已有不少研究和结果, 但远不够深入。

参 考 文 献

- 1 Goldstein G *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975; 72: 11
- 2 Marie-Noëlle Binet *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1989; 17 (5): 2119
- 3 David J Ech *et al.* *J Biol Chem*, 1989; 264: 1887
- 4 Danie Finley. *Cell*, 1987; 48: 1035
- 5 Danie Finley. *Nature*, 1989; 338: 394
- 6 Jovita Mezquita *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1988; 16(24): 11838
- 7 Jonathan R Warner *et al.* *Nature*, 1989; 338: 379
- 8 Maicas EF *et al.* *Molec Cell Biol*, 1988; 8: 169
- 9 Hershko A *et al.* *B B R C*, 1978; 81: 1100
- 10 Rechsteiner M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982; 79: 5857
- 11 Hershko A *et al.* *J Biol Chem*, 1982; 257: 13964
- 12 Esther Eytan *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 7751
- 13 Jentsch S. *Nature*, 1987; 329: 131
- 14 Jentsch S. *TIBS*, 1990; 15: 195
- 15 Nael Carlson *et al.* *J Cell Biol*, 1987; 104(3): 537
- 16 Betal Kirdar *et al.* *Cell Biophysics*, 1989; 14: 143
- 17 Noel Carsch *et al.* *J Cell Biol*, 1987; 104: 542
- 18 Parag HA *et al.* *EMBO*, 1987; 6: 55



胰“RNA-II”治癌成果通过鉴定

吉林延边医学院郑益星、韩明爱二同志自 1981 年开始研究用动物胰脏“RNA-II”治疗癌症, 经 10 年努力, 取得良好成果。1991 年 9 月 1 日, 在吉林省卫生厅主持召开的专家鉴定会上这一成果得到充分肯定并通过鉴定。这种“RNA-II”被定名为“BP 素”, 其作用机制不同于化疗和免疫疗法, 它能直接杀伤离体的癌细胞, 临床应用无副作用, 且能提高免疫能力, 包括干扰素效价的升高。经 308 例临床治疗, 表现对多种癌症有疗效, 使身体状况改善, 生存时间大大延长, 对胰腺癌疗效最好, 典型病例见到癌块内部胞溶, 外部钙化, 31 例受治者已生存 16 个月, 为对照组的 4.5 倍。曾通过有关机构, 用电脑检索国内外文献, 获悉这种胰 RNA 疗法尚无先例, 属于首创。二位表示, 在应用 BP 素的基础上, 结合应用其他低毒性药物, 有望发展出一种“温和药物疗法”, 可为处在无法接受放、化疗阶段的病人继续施治。BP 素已决定在延吉和图们两市的药厂投产。

[中国科学院生物物理研究所陈去恶]