

## 泛素连接酶的结构与功能研究进展\*

杨娜<sup>1)</sup> 侯巧明<sup>1,2)</sup> 南洁<sup>2)</sup> 苏晓东<sup>1,2)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup>北京大学深圳研究生院, 化学基因组实验室, 深圳 518055; <sup>2)</sup>北京大学生命科学学院, 结构生物学实验室, 北京 100871)

**摘要** 泛素化是体内蛋白质翻译后重要修饰之一, 是蛋白质降解的信号. 泛素连接酶 E3 是泛素化过程中的关键酶之一, 介导活化的泛素从结合酶 E2 转移到底物, 不同的泛素连接酶作用于不同的底物蛋白, 决定了泛素化修饰的特异性. 根据结构与功能机制的不同, 可将泛素连接酶 E3 分为 HECT (homologous to E6AP C terminus) 家族和 RING-finger 家族, 前者含有 HECT 结构域, 可直接与泛素连接再将其传递给底物. RING-finger 家族的 E3 发现较晚, 庞大且功能复杂, 是近年来研究的热点, 此家族均包含相似的 E2 结合结构域和特异的底物结合部分, 作为桥梁将活化的泛素从 E2 直接转移到靶蛋白, 其本身并不与泛素发生作用. 总结了这 2 种 E3 连接酶家族成员的三维结构及功能机制研究的最新进展.

**关键词** 泛素连接酶, 底物特异性, HECT, RING-finger, WD40

**学科分类号** Q71

在各种形式的蛋白质翻译后修饰 (post-translational modifications, PTM) 过程中, 泛素化过程近年来引起了越来越广泛的关注, 与蛋白质磷酸化信号传导作用相似, 泛素化在细胞生命活动的许多进程中发挥着至关重要的作用. 2004 年诺贝尔化学奖授予了在“泛素介导的蛋白质降解过程研究”中做出开创性贡献的三位科学家. 泛素是一个由 76 个氨基酸残基组成的高度保守的多肽, 因其广泛分布于各类细胞中而得名, 被泛素标记的蛋白质将被特异性地识别并被迅速降解. 细胞中蛋白质的降解是一个复杂的、被严密调控的过程, 此过程在涉及细胞基本进程 (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<sup>[1]</sup>. 蛋白质降解异常与许多疾病, 如恶性肿瘤、神经退行性疾病的发生、发展密切相关<sup>[2]</sup>. 因此, 阐明泛素在蛋白质降解中的作用机制对理解多种疾病的发生机制和遗传信息的调控表达有重要意义.

### 1 泛素化反应机制

蛋白质的泛素化修饰主要发生在赖氨酸残基的侧链, 且通常是多聚化 (多泛素化) 过程. 被多泛素化修饰的蛋白质会被蛋白酶体 (proteasome) 识别进而被降解. 三种关键的酶共同介导了这一多泛素化过程, 包括泛素活化酶 E1 (ubiquitin

activating enzyme), 泛素结合酶 E2 (ubiquitin conjugating enzyme) 和泛素连接酶 E3 (ubiquitin-protein ligase), 也称底物识别因子 (substrate recognition factor). 它们的作用机制现已基本研究清楚: 首先由 E1 通过其活性中心的 Cys 残基与泛素的 C 端形成硫酯键活化单个游离的泛素 (此步骤需要 ATP), 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 转移到靶蛋白. 由于蛋白酶体识别泛素化的蛋白并将其降解是一个非特异性的进程, 因此, E3 在整个蛋白质的降解过程中发挥了至关重要的作用, 决定了反应的特异性.

### 2 泛素连接酶的分类及特征

通常情况下, 泛素化反应包含一个 E1, 少数几个 E2 和众多 E3. 现已发现的 E3 家族主要有两类, 包括占多数的 RING-finger 家族<sup>[3]</sup> 和 HECT (homologous to E6AP C terminus) 家族<sup>[4]</sup>. RING-finger 家族的 E3 均包含相似的 E2 结合结构域, 作为桥梁将活化的泛素从 E2 直接转移到靶蛋白,

\* 国家自然科学基金(30700115), 深圳市科技研发资金资助项目.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 0755-26032703, E-mail: suxd@szpku.edu.cn

收稿日期: 2007-06-04, 接受日期: 2007-09-17

其本身并不与泛素发生作用<sup>[5]</sup>。而HECT家族的E3除与E2结合外, 均包含HECT催化结构域, 其中保守的Cys残基可与E2携带的泛素形成硫酯键, E2先将泛素传递给E3, 再由E3递呈给底物。随着越来越多的新型泛素连接酶的发现, 理解其功能发挥的结构基础和作用机制已成为当今研究的热点。

## 2.1 HECT家族的泛素连接酶结构与功能特点

HECT家族的E3源自最早发现的E6AP (E6 associated protein)<sup>[6]</sup>, 该蛋白质与人类乳突瘤病毒(papillomavirus)的E6蛋白相互作用后, 介导细胞内抑癌因子p53的降解, 引发宫颈癌的产生。另外, E6AP的E3连接酶功能异常会导致一类神经性疾病, 安琪曼综合症(Angelman's syndrome)的发生。迄今共发现了50种人源的HECT E3, 大小从90~500 ku

不等, 均包含C端的350个残基左右的HECT催化结构域和N端的特异性结构域, 大体可分为包含WW domain蛋白(如Nedd4 家族蛋白)和缺少WW domain蛋白(如E6AP)<sup>[7]</sup>。Nedd4 家族蛋白是研究得比较清楚的一类HECT E3, 也称为C2-WW-HECT E3, 除C端的HECT催化结构域外, 还包含N端的C2磷脂结合结构域用于亚细胞单元的定位, 中间的2~4次重复的WW domain则通过识别PY motif (PPxY) 介导Nedd4与底物的相互作用, 决定了泛素化的特异性。目前在人类中共发现了9种Nedd4 蛋白(表1), 可调节包括基因转录、质膜蛋白的稳定及拥挤、错误折叠蛋白质的降解、抑癌因子的降解(如PTEN)等多种胞内进程<sup>[8,9]</sup>。

Table 1 Structure composition and Function examples of nine different Nedd4 proteins

表 1 9种人源Nedd4蛋白的结构与功能

| Nedd4蛋白   | 结构域组成                           | 介导的泛素化降解过程可调控的对象或进程举例                             |
|-----------|---------------------------------|---------------------------------------------------|
| Nedd4-1   | - C2 - (WW) <sub>4</sub> - HECT | 抑癌因子 PTEN 的降解, HIV 病毒颗粒组装, Liddle 综合征             |
| Nedd4-2   | - C2 - (WW) <sub>4</sub> - HECT | 上皮钠离子通道 EnaC, 电压门控钾离子通道, 氯离子通道 CIC-5              |
| Smurf1    | - C2 - (WW) <sub>2</sub> - HECT | TGF- $\beta$ 受体, 肿瘤细胞的运动性, BMP/Smad1 通路, RhoA 的降解 |
| Smurf2    | - C2 - (WW) <sub>3</sub> - HECT | TGF- $\beta$ 受体, GTP 酶 Rap1B 在形成神经元极性中的作用         |
| AIP4/Itch | - C2 - (WW) <sub>4</sub> - HECT | 细胞命运调节因子 Notch, 闭锁蛋白 Occludin, JunB               |
| WWP1      | - C2 - (WW) <sub>4</sub> - HECT | p53 的定位及转录, Kruppel-like factor 5                 |
| WWP2      | - C2 - (WW) <sub>4</sub> - HECT | 转录因子 Oct4, 上皮钠离子通道                                |
| NEDL1     | - C2 - (WW) <sub>2</sub> - HECT | 超氧化物歧化酶 1 突变体                                     |
| NEDL2     | - C2 - (WW) <sub>2</sub> - HECT | 稳定 p73 及其转录调控                                     |

现已有3种HECT家族的E3有三维结构报道, 包括E6AP, WWP1和Smurf2<sup>[10~12]</sup>。E6AP HECT结构域和E2复合物的晶体结构由Pavletich课题组于1999年首先获得解析, 开启了我们认识这类泛素连接酶的大门。如图1a所示, E6AP的HECT结构域包含较短的C-lobe 和较长的N-lobe, 二者由柔性的linker相连, 大体呈躺倒的L型。其中C-lobe包含活性中心的Cys残基, N-lobe则负责与E2相连。奇怪的是HECT domain的活性Cys残基与E2活性中心的Cys残基相距40Å之遥, 这样大的距离很难完成泛素在二者之间的传递, 因此推测该酶在催化过程中应存在较大的构象变化。

来自Nedd4家族的WWP1蛋白的HECT催化结构域于2003年由Verdecia等<sup>[11]</sup>解析, 为我们理解HECT类E3酶的构象变化提供了新的证据和线索。如图1b所示, WWP1蛋白的HECT结构域也由C-lobe 和N-lobe组成, lobe本身与E6AP非常相似, 只是二者之间连接的linker发生了较大的变化, 使得C-lobe位于N-lobe的中间, 整体呈T型结构。这

种构象变化使得HECT domain与E2活性中心Cys残基间的距离缩短到16Å(计算模拟)。进一步通过计算, Verdecia 等提出了一个催化模型(图1c): E3通过linker区进一步的构象变化使其催化中心更加靠近E2的催化中心, 两Cys残基间的距离只有5Å, 使得泛素在二者之间的传递成为可能。为了证实这种构象变化模型, 作者通过定点突变实验改变linker区的柔性以及2个lobe间接接触面的稳定性, 发现均会影响该E3酶的催化活性。新近的实验结果也进一步证实了此模型的存在<sup>[13,14]</sup>。

然而, 关于HECT家族的E3是如何识别特异性底物及其催化活性是如何被调节的研究还在积累之中。已知Nedd4家族的蛋白质是通过其2~4次重复的WW domain直接与包含PY motif的底物结合, 一些重要的衔接蛋白(adaptor)也可通过各种不同的方式介导连接酶与底物之间的相互作用<sup>[8]</sup>。另外, 通过调节HECT结构域的催化能力来调控该类酶的活性也是很重要的方面。Smurf 2蛋白的结构及功能研究为我们提供了典型的例证<sup>[12]</sup>。众所周知, TGF- $\beta$

信号传导通路在细胞的生长、分化等重要进程中发挥着至关重要的作用, 对于该通路的各种调节机制均是研究的热点. Smurf2蛋白可介导完成TGF- $\beta$ 受体的泛素化降解过程, 这一进程受一种抑制型的Smad蛋白, Smad7所调控. Smad7蛋白由N端的NTD结构域, 中间的PY motif, 以及MH2结构域组成. 其中PY motif可与Smurf2的WW domain结合, 而MH2结构域可与TGF- $\beta$ 受体结合, 因此Smad7介导Smurf2与底物间的结合. 更为有意思的是, 发现NTD结构域不但可与Smurf2的HECT结构域结合,

还可与E2(UbcH7)结合. 根据进一步结构分析及突变实验结果, 发现Smurf2的HECT结构域本身与E2的亲和力非常的低, Smad7则通过帮助Smurf2募集E2来激活其连接酶的活性. 于是在对Smurf2连接酶的调控中, Smad7发挥了双重的作用, 不但介导了Smurf2的WW domain与底物的结合, 也调控其HECT结构域与E2之间的亲和作用, 从而激活Smurf2蛋白的泛素连接酶催化活性, 完成底物TGF- $\beta$ 受体泛素化依赖的降解过程.

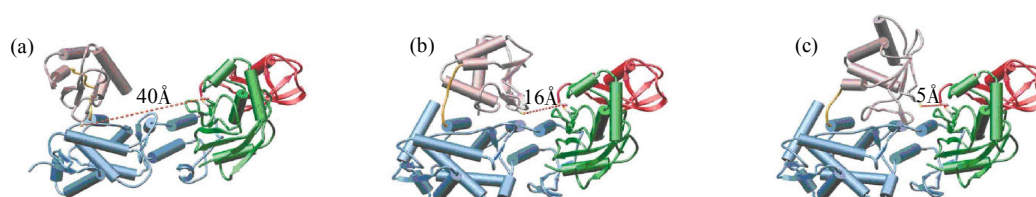


Fig. 1 Conformational change models of HECT domain <sup>[11]</sup>

图1 HECT 结构域的构象变化 <sup>[11]</sup>

蓝色为N-lobe, 紫色为C-lobe, 绿色代表E2, 红色代表泛素. (a) E6AP-UbcH7 (E2)复合物结构. (b) WWP1晶体结构及与E2复合物结构模拟. (c) 催化模型.

## 2.2 RING-finger家族的泛素连接酶结构与功能特点

### 2.2.1 RING-finger家族E3的组成.

RING-finger 连接酶家族的成员除了少数为单分子(如MDM2, c-Cbl)外, 均为多个分子的复合物, 如APC/C, SCF复合物等. 它们均包含相似的E2结合结构域RING和各异的底物识别复合体. 与HECT家族的连接酶不同的是, RING-finger 连接酶没有催化结构域, 不与泛素直接发生作用, 只是起到桥梁作用, 将挑选的底物与E2募集到一起, 完成泛素从E2到底物之间的传递过程.

其中Cullin-Ring-based E3-Ligases (CRLs) 构成了此类泛素连接酶的主体<sup>[3]</sup>. 目前, 在人类细胞中共发现了7种cullin(表2), 其作用类似活性E3组装的“支架”, C端通过结合Rbx (E2 binding Ring finger protein) 蛋白与E2相连, N端则与底物受体相连.

在已发现的Cullin中, Cul1和Cul7通过与SKP1和不同的F-box protein结合来招募特征底物, Cul2和Cul5通过结合elonginBC以及VHLbox和SOCSbox来捕获特异性底物, Cul3则通过BTB结构域与底物结合. 最新又发现Cul4A通过与DDB1和不同的DCAF (DDB1-Cul4 associated factors)分子相互作用来招募底物.

目前, 在哺乳动物中发现了大于60种Fbox, 40种SOCS, 近200种BTB蛋白和数十种DCAF分子, 可见Cullin蛋白可构成非常庞大的泛素连接酶家族. 它们作用的底物及可调节的对象遍及细胞周期(如Cyclin D/E, p53, p21, p27, p57, WEE1), 信号传导(如 $\beta$ -catenin, IFNAR1, SMAD3/4, Notch 1/4), 转录调节(如E2F1, ATF4, HIF 1 $\alpha$ /2 $\alpha$ , Jun, NF- $\kappa$ B1/2), DNA复制(如CDT1, ORC1), 生长发育(如E2A)等许

Table 2 Cullin-RING-Ligase (CRL) family

表2 Cullin-RING-Ligase (CRL) 连接酶家族

| Cullin | CRL 组成                                   | 名称                        |
|--------|------------------------------------------|---------------------------|
| CUL1   | F-box protein/SKP1/CUL1/RING             | SCF, CDL1                 |
| CUL2   | SOCS/BC-box protein/elongin BC/CUL2/RING | VBC, CBC, ECS, SCF2, CDL2 |
| CUL3   | BTB-domain protein/CUL3/RING             | BCR3, SCF3, CDL3          |
| CUL4A  | DCAF/DDB1/CUL4A/RING                     | DDC, CDL4                 |
| CUL4B  | ?/CUL4B/RING                             | -                         |
| CUL5   | SOCS/BC-box protein/elongin BC/CUL5/RING | SCF5, CDL5                |
| CUL7   | FBX29/SKP1/CUL7/RING                     | SCF7, CDL7                |

多至关重要的胞内进程, 发挥着难以估量的作用。

目前已获得结构解析的CRL主要有两种, 一类是Cul1参与的 SCF复合物的晶体结构, 另一类是Cul4A参与的DCAF/DDB1/Cul4A/RING复合物的部分晶体结构。另外, 虽然Cul2 和Cul3的结构尚未获得解析, 其衔接蛋白elongin BC及BTB-domain已有一些三维结构报道, 在此不做详述, 可参见文献[15, 16]。

**2.2.2 SCF连接酶复合物结构与功能研究。** 研究最为清楚的CRL是SCF(Skp1-Cul1-Fbox)蛋白复合物, 该复合物的三维晶体结构于2002年由Pavletich课题组解析<sup>[17]</sup>。解析的精确三维结构表明(图2), Cullin1由一个长柄状结构域(NTD)和一个球状结构域(CTD)组成。球状结构域结合环指蛋白Rbx1并进而与E2结合; 长柄状结构域由3个重复的新型五螺旋结构域组成, 其N端结合Skp1和Fbox<sup>skp2</sup>蛋白, Fbox蛋白则通过其特有的介导蛋白质与蛋白质相互作用的模式来捕获不同的底物, 是决定泛素化特异性的关键所在。Cul1作为一个长“支架”, 将结合了泛素的E2和特异性底物募集在一起, 完成蛋白质的泛素化过程。

三维结构分析表明, Skp1-Fbox<sup>skp2</sup>-Cul1-Rbx复合物整体构架非常刚性, 缺少柔性的连接部分, 包括Skp1与F-box及Cul1相互之间, 以及Cul1本身NTD与CTD之间的连接都是十分刚性。通过定点突变实验改变Cul1的NTD与CTD之间柔性, 发现该突变体丧失了体外泛素化p27的能力<sup>[17]</sup>。说明Cul1及整个SCF复合物的刚性是确保此类E3连接酶活性所必需的, 分析模拟得到的SCF复合物与E2之间相互作用的模型(图2), 发现从E2活性中心的半胱氨酸

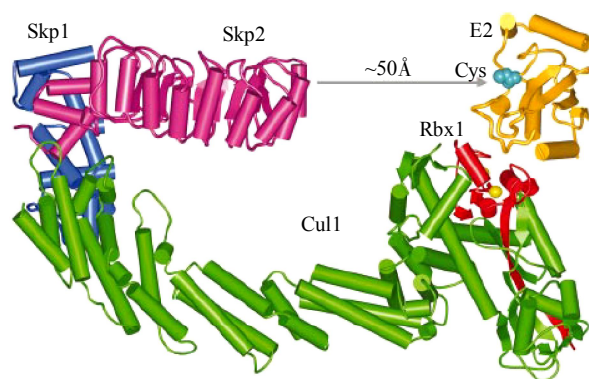


Fig. 2 A model of SCF<sup>skp2</sup> - E2 complex based on the crystal structure of Cul1-Rbx1-Skp1-Fbox<sup>skp2</sup> complex<sup>[17]</sup>

图2 Cul1-Rbx1-Skp1-Fbox<sup>skp2</sup>复合物晶体结构及与E2相互作用的模型<sup>[17]</sup>

残基到Fbox<sup>skp2</sup>的LR(leucine-rich)重复区的距离约50Å。而分析p27分子的结构发现, 其结合于Skp2 LR重复区的残基(磷酸化的Thr187)与其潜在的泛素化标记位点(Lys134, Lys153和Lys165)之间的距离刚好与这个尺寸相当。Cul1的长杆状结构为不同大小底物的结合及底物的活性位点向E2的呈递提供了足够的空间, 作为桥梁将E2活性中心的半胱氨酸残基和底物的靶赖氨酸残基靠近在一起, 完成泛素在二者之间的传递。

最新在植物中也发现了类似SCF复合物的泛素连接酶家族新成员, 即TIR1-ASK1复合物, 华盛顿大学的郑宁课题组再次在泛素连接酶领域获得突破, 解析了该植物泛素连接酶的三维晶体结构, 同时首次建立了植物生长激素受体的结构模型<sup>[18]</sup>。

**2.2.3 Cul4类泛素连接酶复合物结构与功能研究。** Cul4A-DDB1-WD40是最新发现的一种CRL泛素连接酶, 可以调节包括DNA修复, DNA复制和转录, 病毒感染等多种进程。Cul4A可与DDB1蛋白(UV-damaged DNA-binding protein 1)和ROC1(一种Ring finger蛋白)相互作用构成E3, 其晶体结构由华盛顿大学的郑宁课题组2006年9月发表<sup>[19, 20]</sup>。如图3所示, Cul4A的结构与Cul1非常类似, 由长弓形的NTD螺旋结构域和球状的CTD结构域构成, CTD结合ROC1环指蛋白招募E2, 而其N端结合的DDB1蛋白结构上与Skp1蛋白有很大差异。DDB1蛋白由3个β-propeller结构域构成, 其中BPB结构域相对独立, 是与Cul4A结合的部分, BPA和BPC结构域紧密相连, 提供了底物结合的平台。然而这样的一个连接酶, 其底物结合的特异性是如何实现的呢? 从其他的CRL推导, 应该存在功能上类似Fbox或SOCS的一类分子, 即可与DDB1结合, 又能与不同的底物相结合。

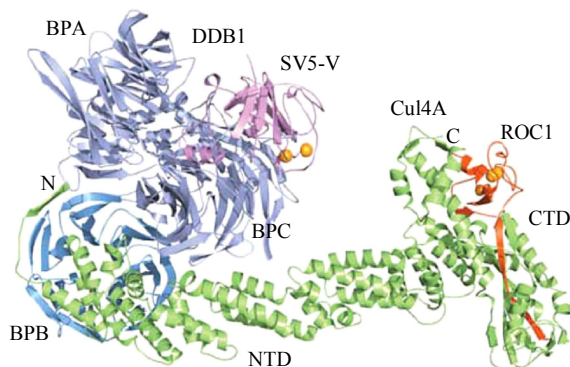


Fig. 3 Crystal structure of DDB1-Cul4A-ROC1 E3 ligase complex<sup>[20]</sup>

图3 DDB1-Cul4A-ROC1泛素连接酶复合物晶体结构<sup>[20]</sup>

2006年9月~10月期间, 共有4个课题组几乎同时报道他们发现了可与Cul4A-DDB1相互作用的因子<sup>[20~23]</sup>, 各有不同的命名, 此处统一称为DCAF (DDB1-Cul4 associated factors). 在他们发现的几十种DCAF中, 绝大部分都是WD40蛋白.

WD40重复序列是一类广泛存在于真核生物体内, 结构保守、功能复杂的蛋白质, 已发现有几百种, 主要通过介导蛋白质间的相互作用发挥其功能, 可参与调节包括信号转导、mRNA剪接、组蛋白修饰、细胞骨架组装和细胞周期调控等重要过程<sup>[24,25]</sup>. 其重复保守区一般由40~60个氨基酸残基组成, N端由甘氨酸-组氨酸(GH)开始, C端到色氨酸-天冬氨酸(WD)结束. 重复的GH和WD之间的保守核心共同组成稳定的 $\beta$ -propeller结构. 典型的 $\beta$ -propeller结构一般包含7~8个 $\beta$ -blades, 每个blade由4条反平行的 $\beta$ -strands组成, 共同形成一个封闭的中空桶状propeller结构<sup>[26]</sup>. 研究表明位于propeller顶部和底部的极性氨基酸残基通常是WD40蛋白与其他蛋白质相互作用的活性部位. WD40家族蛋白一般通过与其他一个或几个蛋白质相互作用发挥其功能. 它的结构重复单元对称地排列在一起, 为蛋白质间的相互作用提供了平台. 而其结构表面不同的疏水性、电荷和空间位阻决定蛋白质识别的特异性.

在所发现可与DDB1相互作用的WD40蛋白中, 很多都具有重要的生理功能. 比如一种称为L2DTL/CDT2(human homologue of *Drosophila* lethal (2) denticleless protein/ fission yeast CDC10 transcript 2)的分子, 包含一个N端WD40结构域和C端结构域, 可与Cul4A-DDB1和PCNA (proliferating cell nuclear antigen)相互作用介导CDT1蛋白在DNA发生损伤时的降解过程<sup>[21,27]</sup>. CDT1是DNA复制许可蛋白(replication licensing), 当DNA发生损伤时(如紫外线的照射), CDT1被大量降解, 阻止DNA复制的进行, 保护基因组的正确. 同时细胞由S期进入G1期时, CDT1也会被大量降解. 人为阻断CDT1的降解途径会使细胞停滞在S期, 造成多核现象. 进一步的研究又发现, Cul4A-DDB1-L2DTL泛素连接酶可与PCNA和MDM2相互作用, 调控p53蛋白的多泛素化和降解过程<sup>[28]</sup>. 众所周知, p53是所有肿瘤抑制因子中研究的最为广泛的, 其作用机制也相当复杂. 这个被称为“基因组守护者”的抑癌蛋白从1979年发现以来一直备受关注. 人类50%以上

的肿瘤组织中均发现有p53基因的突变或表达异常, 预示着p53与人类肿瘤的发生发展密切相关. 同时p53介导的信号传导途径在细胞的生长、分化、衰老、应激等生命过程中也起着重要的调控作用. 保持野生型p53的功能及正常的表达水平, 抑制癌细胞内p53的降解途径是抗肿瘤研究的活跃方向. 已发现调控p53的泛素化降解过程有三条途径, 一是受HECT家族连接酶Mule/ARF-BP1调节<sup>[29]</sup>, 二是依赖Cul1-Skp1-FBL7连接酶与其C端的相互作用, 三是最新发现的N端依赖Cul4-DDB1-L2DTL、PCNA和MDM2共同作用的降解过程. MDM2也称HDM2, 本身可作为一种E3, 但只能单泛素化p53, p53的多泛素化还需依赖特定的E3, 即Cul4-DDB1-L2DTL和PCNA. 推测PCNA的作用是将p53、MDM2和L2DTL联系到一起, 完成泛素的转移过程.

由于没有三维结构信息, 无法直接证实DDB1是如何与WD40蛋白相互作用的. 通过序列分析发现, 能与DDB1结合的WD40蛋白大都存在2个保守的WDxR/K motif, 分别位于2个相邻的blade的C端. 从几个结构已知的WD40蛋白(WDR5、TLE1)来看, Double WDxR/K box中高度保守的Asp和Arg残基位于桶状propeller的底面, 推测是WD40蛋白与DDB1结合的关键位点之一. 进一步定点突变实验表明, 将Double WDxR/K box中的任一Arg突变, 都使WD40蛋白对DDB1的结合能力明显减弱. 然而一些不包含WDxR/K motif的WD40蛋白也证明能与DDB1结合<sup>[21]</sup>. 分析目前唯一获得的DDB1-底物复合物晶体结构<sup>[19,20]</sup>(图3), 紫色表示的SV5-V(V protein of simian virus 5)蛋白并不包含WD40结构域, 主要是通过其C端的 $\alpha$ 螺旋结构与DDB1的BPC结构域相互作用, 而BPA结构域则存在进一步结合其他蛋白质的位点和空间. 于是就存在下面的问题, WD40蛋白是竞争SV5-V的结合位点呢, 还是会结合在另外的BPA位置? 由于大多数WD40蛋白除了WD40结构域, 还包含其他的结构, 那么除了WDxR/K motif, WD40蛋白是否存在其他的可与DDB1相互作用的位点? 不同的WD40蛋白是否以同样或各异的方式结合在DDB1上? 弄清楚上述问题是揭示新型泛素连接酶Cul4-DDB1-WD40如何实现底物特异性的关键, 这对我们了解细胞内许多重要进程, 如DNA损伤修复, 组蛋白翻译后修饰, 细胞周期调控, 肿瘤的发生等都具有重要的意义.

### 3 结束语

关于泛素化过程的许多细节我们还并不了解, 比如泛素是一个接一个地加到底物上呢, 还是事先聚合好(多发生于泛素的K48或K63残基间的聚合), 再连接到底物上? 已有最新的证据表明, RING家族的一种E3可传递聚合好的泛素给底物, 这种泛素的多聚化过程是由2个相同的E2分子共同完成的<sup>[9]</sup>。然而这一过程能成为RING E3家族的共同规律吗? 在HECT E3家族中也能实现吗? HECT家族的E3本身也有催化活性, 这一多聚化过程会不会由E3来完成呢? 随着越来越多的新型泛素连接酶的发现, 更多的三维结构信息和功能研究成果的不断积累, 我们对这类具有重要功能的酶家族会有进一步更深入的认识。

### 参考文献

- Pickart C M. Back to the future with ubiquitin. *Cell*, 2004, **116** (2): 181~190
- Guardavaccaro D, Pagano M. Oncogenic aberrations of cullin-dependent ubiquitin ligases. *Oncogene*, 2004, **23** (11): 2037~2049
- Petroski M D, Deshaies R J. Function and regulation of culling-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6** (1): 9~20
- Zheng N. A closer look of the HECTic ubiquitin ligases. *Structure*, 2003, **11**(1): 5~6
- Joazeiro C A, Weissman A M. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*, 2000, **102**(5): 549~552
- Rolfe M, Beer-Romero P, Glass S, *et al.* Reconstitution of p53-ubiquitinylation reactions from purified components: the role of human ubiquitin-conjugating enzyme UBC4 and E6-associated protein (E6AP). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(8): 3264~3268
- Kee Y, Huibregtse J M. Regulation of catalytic activities of HECT ubiquitin ligases. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **354**(2): 329~333
- Shearwin-Whyatt L, Dalton H E, Foot N, *et al.* Regulation of functional diversity within the Nedd4 family by accessory and adaptor proteins. *Bioessays*, 2006, **28**(6): 617~628
- Wang X, Trotman L C, Koppie T, *et al.* NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell*, 2007, **128** (1): 129~139
- Huang L, Kinnucan E, Wang G, *et al.* Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science*, 1999, **286**(5443): 1321~1326
- Verdecia M A, Joazeiro C A, Wells N J, *et al.* Conformational flexibility underlies ubiquitin ligation mediated by the WWP1 HECT domain E3 ligase. *Mol Cell*, 2003, **11**(1): 249~259
- Ogunjimi A A, Briant D J, Pece-Barbara N Le, *et al.* Regulation of Smurf2 ubiquitin ligase activity by anchoring the E2 to the HECT domain. *Mol Cell*, 2005, **19** (3): 297~308
- Wang M, Pickart C M. Different HECT domain ubiquitin ligases employ distinct mechanisms of polyubiquitin chain synthesis. *EMBO J*, 2005, **24**(24): 4324~4333
- Wang M, Cheng D, Peng J, *et al.* Molecular determinants of polyubiquitin linkage selection by an HECT ubiquitin ligase. *EMBO J*, 2006, **25**(8): 1710~1719
- Stebbins C E, Kaelin W G Jr, Pavletich N P. Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science*, 1999, **284**(5413): 455~461
- Ahmad K F, Melnick A, Lax S, *et al.* Mechanism of SMRT corepressor recruitment by the BCL6 BTB domain. *Mol Cell*, 2003, **12**(6): 1551~1564
- Zheng N, Schulman B A, Song L, *et al.* Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*, 2002, **416** (6882): 703~709
- Tan X, Calderon-Villalobos L I, Sharon M, *et al.* Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*, 2007, **446** (7136): 621~622
- Li T, Chen X, Garbutt K C, *et al.* Structure of DDB1 in complex with a paramyxovirus V protein: viral hijack of a propeller cluster in ubiquitin ligase. *Cell*, 2006, **124** (1): 105~117
- Angers S, Li T, Yi X, *et al.* Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. *Nature*, 2006, **443** (7111): 590~593
- Jin J, Arias E E, Chen J, *et al.* A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1. *Mol Cell*, 2006, **23**(5): 709~721
- Higa L A, Wu M, Ye T, *et al.* CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation. *Nat Cell Biol*, 2006, **8**(11): 1277~1283
- He Y J, McCall C M, Hu J, *et al.* DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4-ROC1 ubiquitin ligases. *Genes Dev*, 2006, **20**(21): 2949~2954
- Neer E J, Schmidt C J, Nambudripad R, *et al.* The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*, 1994, **371** (6495): 297~300
- Smith T F, Gaitatzes C, Saxena K, *et al.* The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci*, 1999, **24** (5): 181~185
- Han Z, Guo L, Wang H, *et al.* Structural basis for the specific recognition of methylated histone H3 lysine 4 by the WD-40 protein WDR5. *Mol Cell*, 2006, **22**(1): 137~144
- Higa L A, Banks D, Wu M, *et al.* L2DTL/CDT2 interacts with the CUL4/DDB1 complex and PCNA and regulates CDT1 proteolysis in response to DNA damage. *Cell Cycle*, 2006, **5**(15): 1671~1677
- Banks D, Wu M, Higa L A, *et al.* L2DTL/CDT2 and PCNA interact with p53 and regulate p53 polyubiquitination and protein stability through MDM2 and CUL4A/DDB1 complexes. *Cell Cycle*, 2006, **5** (15): 1719~1729
- Chen D, Brooks C L, Gu W. ARF-BP1 as a potential therapeutic

target. Br J Cancer, 2006, **94** (11): 1555~1558  
30 Li W, Tu D, Brunger A T, *et al.* A ubiquitin ligase transfers

preformed polyubiquitin chains from a conjugating enzyme to a substrate. Nature, 2007, **446** (7133): 333~337

## Progress in Structural and Functional Study of Ubiquitin Ligases\*

YANG Na<sup>1)</sup>, HOU Qiao-Ming<sup>1,2)</sup>, NAN Jie<sup>2)</sup>, SU Xiao-Dong<sup>1, 2)\*\*</sup>

<sup>1)</sup> Peking University Shenzhen Graduate School, Laboratory of Chemical Genomics, Shenzhen 518055, China;

<sup>2)</sup> Peking University, College of Life Sciences, Beijing 100871, China)

**Abstract** Ubiquitination on target proteins is the signal of cellular protein degradation. Ubiquitin ligase E3 is one of the key enzymes in ubiquitination, it recognizes a specific substrate protein and recruits an ubiquitin conjugating enzyme E2, mediating the ubiquitin transfer from the E2 to the substrate protein. Ubiquitin ligase E3 can be divided into two subfamilies according to their different structure characters and function mechanisms, the HECT (homologous to E6AP C terminus) family and the RING-finger family. Members of the HECT E3 share the common HECT catalytic domain, which can bind to an E2 and load the ubiquitin on themselves before catalyzing the transfer of ubiquitin to the target proteins. While the RING-finger E3 all contain an similar E2 binding domain and a unique substrate binding part, mediating direct ubiquitin transfer from the E2 to the substrate. The most recent progresses in the structural and functional studies of these two E3 families were summarized.

**Key words** ubiquitin ligase, substrate specificity, HECT, RING-finger, WD40

---

\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30700115) and Science and Technology Research Foundation of Shenzhen city.

\*\*Corresponding author. Tel: 86-755-26032703, E-mail: suxd@szpku.edu.cn

Received: June 4, 2007 Accepted: September 17, 2007