

非泛素依赖地降解蛋白质研究进展*

陈季武** 左秋红 计磊 李晓涛

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要 如何识别和选择性降解蛋白质是细胞生命过程中非常重要的环节, 泛素-蛋白酶体降解途径的发现, 揭示了蛋白质在细胞内选择性降解的普遍方式, 成为研究焦点。然而, 很少关注蛋白酶体以非泛素依赖方式降解蛋白质的可能性。近年来, 已发现不少蛋白质被蛋白酶体以非泛素依赖方式降解。该途径涉及降解某些短寿命的调节蛋白、错误折叠蛋白、衰老蛋白和氧化蛋白, 以及新合成蛋白的“质量控制”, 并涉及病理过程如癌症、神经退行性疾病, 所以具有非常重要的生理和病理作用。总结了近一二十年来发现的一些具有代表性的被蛋白酶体以非泛素依赖方式降解的蛋白质, 并重点论述了其作用的分子机制, 以期以点带面地展示这一领域的研究概况。

关键词 蛋白酶体, 非泛素依赖, 蛋白质降解, REG γ

学科分类号 Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00569

蛋白质会因突变、转录或翻译出错、氧化或其他环境应激而导致损伤, 也会因蛋白质加工出错而导致蛋白质错误折叠, 还会因新陈代谢需要而降解特定蛋白质, 这些蛋白质如不及时降解, 就会产生有害效应^[1], 甚至导致疾病, 所以细胞进化产生了蛋白质降解体系。已发现有 4 种蛋白质水解体系, 分别是自噬-溶酶体体系、线粒体蛋白酶体系、钙依赖蛋白酶体系和泛素-蛋白酶体体系^[2]。其中, 自噬-溶酶体体系是第一个被发现的蛋白质水解体系, 泛素-蛋白酶体体系是近 30 年来发现的蛋白质降解体系^[3]。但值得注意的是, 近年来, 已陆续发现不少蛋白质被蛋白酶体以非泛素依赖方式降解。所以细胞内蛋白酶体降解蛋白质可分为泛素依赖和非泛素依赖。目前的资料表明, 真核细胞中非溶酶体蛋白质降解主要依赖于蛋白酶体的作用, 细胞内被降解的蛋白质 70%~80% 以上由蛋白酶体体系负责降解, 主要降解短寿命蛋白质如新合成的蛋白质、错误折叠的蛋白质和调节蛋白质。其中泛素-蛋白酶体体系已得到广泛研究和报道, 蛋白酶体非泛素依赖地降解蛋白质的研究相对较少, 其识别非泛素化底物的机理不甚清楚, 报道的机理有多种, 还没有发现像泛素-蛋白酶体降解需泛素活

化、偶联和连接这样有一个共同机理, 但已有的研究显示, 非泛素依赖的蛋白酶体降解途径具有非常重要的生理和病理作用。本综述主要通过多种典型蛋白质降解介绍非泛素依赖的蛋白酶体降解蛋白质途径, 并重点论述了其作用的分子机制, 以期以点带面地展示这一领域的研究概况。

1 非溶酶体蛋白质降解的主要体系: 蛋白酶体体系

蛋白酶体是多亚基的、把蛋白质降解为含 7 至 9 个氨基酸肽段的蛋白酶, 是负责选择性降解短寿命调节蛋白质和损伤蛋白质的主要蛋白酶^[4], 有酶促活性的蛋白酶体是由圆柱形的 20 S 核心颗粒和 3 个蛋白酶体激活因子: PA700、PA28 和 PA200 构成, 20 S 核心颗粒是由 4 个七聚体环堆叠而成: 2 个外 α 环在两端, 2 个内 β 环在中间, 形成 $\alpha\beta\beta\alpha$ 结构。 α 环负责结合调节因子, β 环含有肽谷氨酰

* 国家自然科学基金资助项目(30870503, 81071657, 30811120435)。

** 通讯联系人。

Tel: 021-62233547, E-mail: jwchen@bio.ecnu.edu.cn

收稿日期: 2010-11-05, 接受日期: 2011-02-14

基肽水解酶、胰蛋白酶样和胰凝乳蛋白酶样活性位点(分别为 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\beta 5$)^[1-4]。当蛋白质底物进入由2个 β 环构成的20 S腔内,蛋白质被降解为肽段。然而,没有蛋白酶体激活因子,20 S的 α 环通常被其氨基端的肽所阻止而关闭,蛋白质底物被阻止进入20 S腔内^[5-6]。当蛋白酶体激活因子结合 α 环时, α 环氨基端的肽阻止被解除,其孔成为蛋白质底物进入20 S蛋白酶体的入口^[5]。20 S蛋白酶体存在于细胞核和细胞质中^[7]。

如图1所示,19 S(或PA700)蛋白酶体激活因子结合20 S形成26 S蛋白酶体,这是一种ATP和泛素依赖的蛋白酶复合体。大多数细胞蛋白质是泛素化后经26 S蛋白酶体降解,泛素-蛋白酶体体系是降解蛋白质的最主要体系之一。已在19 S激活因子内发现6种不同的ATP酶亚基,它们很可能在蛋白质底物转入20 S腔前提供ATP、解折叠蛋白质底物并使蛋白质底物去泛素化^[5]。

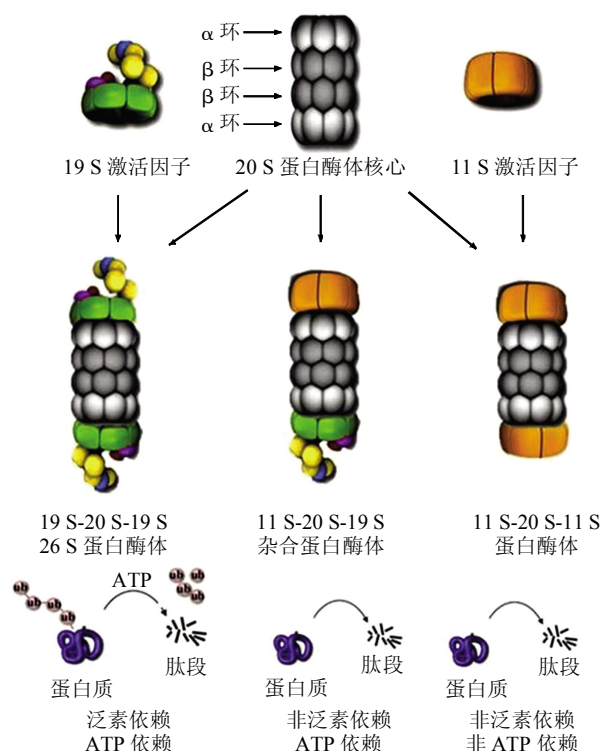


Fig. 1 Proteasome activators and ubiquitin-dependent and -independent degradation

图1 蛋白酶体激活因子和泛素依赖、非泛素依赖降解20 S核心是由2个外 α 环和2个内 β 环组成的桶形圆柱体。 α 环调节蛋白质底物的进入,而 β 环行使蛋白质降解功能。在真核细胞中至少有2类蛋白酶体激活因子:19 S和11 S。19 S激活因子以ATP依赖的方式结合20 S蛋白酶体以形成26 S蛋白酶体,该26 S蛋白酶体主要负责降解泛素化的蛋白质。

然而,蛋白酶体激活因子REG(也称为11 S或PA28)不含ATP酶活性,不依赖ATP和泛素介导蛋白酶体降解^[5-6, 8]。在3种REG家族成员中,REG α 和REG β 的氨基酸约有50%同源性,而REG γ 的氨基酸与REG α 和REG β 的氨基酸仅有25%同源性^[9]。REG α/β 主要位于细胞质,一起形成异七聚体帽状结构,REG γ 主要位于细胞核并形成同七聚体帽状结构,但在有丝分裂期间,核膜破裂,REG γ 分布于整个细胞。REG α/β 仅发现于脊椎动物中,而REG γ 在脊椎动物和无脊椎动物之间高度保守。REG不参与泛素化蛋白质的识别,然而影响20 S蛋白酶体降解蛋白质的活性^[5-6]。

除了上述19 S和11 S激活因子外,还发现了PA200, PA200是分子质量为200 ku单体结构的激活因子,可激活蛋白酶体降解肽而不能降解蛋白质^[4]。这3种激活因子与20 S蛋白酶体至少组成4种蛋白酶体复合物:19 S-20 S-19 S、11 S-20 S-11 S、11 S-20 S-19 S和PA200-20 S-19 S,后两者被称为杂交蛋白酶体。

26 S蛋白酶体主要通过泛素依赖地降解蛋白质,但也可非泛素依赖地降解某些蛋白质,一个范例是鸟氨酸脱羧酶,其他包括p21、p53、眼癌蛋白质和TCRa等蛋白质。20 S蛋白酶体本身也可直接降解非结构和部分解折叠的蛋白质,例如以非ATP和非泛素依赖的方式降解氧化蛋白质。然而,蛋白酶体识别和降解非泛素化底物的机理尚未很清楚^[9]。

2 降解衰老、氧化和解折叠的蛋白质

衰老、氧化和解折叠的蛋白质都是研究蛋白酶体非泛素依赖降解的最好底物之一。

衰老蛋白质构成了一系列自发的、非酶促修饰,包括天冬酰胺残基脱氨基和天冬氨酸残基异构化,这不仅使蛋白质功能失活,而且也增大了蛋白质衰变速率。钙调蛋白(CaM)就是因半寿命期长而成为研究衰老蛋白质降解的模式底物,其体外重现产生的衰老蛋白质化学修饰特征与体内产生的衰老蛋白质相似。当CaM在体内外衰老时经历自发化学修饰(即脱酰胺和外消旋作用),导致表面出现异天冬酰胺残基。应用微注射把这些衰老CaM注入非洲蟾蜍卵母细胞内,可被迅速降解。反之,把新纯化的CaM注入卵母细胞内,CaM稳定很长时间。如果把蛋白酶体特异抑制剂乳胞素注入卵母细胞内,衰老CaM不被降解,表明蛋白酶体可快速

降解衰老 CaM. 在 HeLa 细胞提取液中, 衰老 CaM 降解速度比天然 CaM 快 8 倍, 而 HeLa 细胞内提取的衰老 CaM 结合泛素的速度并不比天然 CaM 快. 当利用 EGTA 除去 Ca^{2+} 时, 结合衰老 CaM 和天然 CaM 的泛素急剧下降, 但衰老 CaM 和天然 CaM 的降解依然增多. 因此, 衰老 CaM 和天然 CaM 的泛素化与其较快降解无关. 而且, 纯化的 26 S 蛋白酶体能够非泛素依赖地降解衰老 CaM, 但需 ATP^[10].

氧化损伤蛋白质积累是衰老细胞的特征, 也是若干衰老相关病理的特征. 然而, 在年轻和健康细胞内, 轻度氧化的蛋白质被蛋白酶体选择性识别和迅速降解, 避免了毒性的、变性的蛋白质聚集积累, 20 S 蛋白酶体在这一过程中起关键作用. a. 20 S 蛋白酶体复合物能主动识别和以非泛素依赖的方式降解氧化蛋白质. b. 体外降解分析表明, 氧化的铁蛋白和溶菌酶与非氧化铁蛋白和溶菌酶相比, 优先被蛋白酶体降解, 即使氧化也不增加泛素化; 氧化蛋白质的降解率不被 ATP 明显改变, 提示该途径不需能量. c. 在 Ube1 温度敏感型细胞系内温度提升泛素化, 氧化蛋白质在氧化应激期间仍以正常速率降解. 所以实验支持 20 S 蛋白酶体在降解氧化蛋白质中起主要作用这一概念: 这是因为在体内 20 S 蛋白酶体构成最丰富的蛋白酶体种, 即游离 20 S 核心颗粒构成了蛋白酶体总量的大部分, 并分布在细胞核和细胞质中^[7, 11]. 而 26 S 蛋白酶体甚至在有 ATP 和有识别功能的泛素体系条件下降解氧化蛋白质也不太有效, 而且, 相对温和的氧化应激迅速(但可逆)地钝化完整细胞内的泛素活化/结合系统和 26 S 蛋白酶体活性, 而不影响 20 S 蛋白酶体的活性^[9, 12].

氧化蛋白质是如何被蛋白酶体识别和降解的? 氧化引起蛋白质各种修饰, 导致氧化蛋白质构象重排并暴露疏水补丁, 部分解折叠也形成疏水表面补丁, 因此被 20 S 蛋白酶体更有效地识别, 加速降解. 典型例子是 CaM 的特异甲硫氨酸氧化时 CaM 三级结构急剧重排, 这与其被蛋白酶体加速降解一致. 因此蛋白质不稳定的一种可能解释是氧化蛋白质的化学修饰取代了 19 S 激活因子对底物所进行的依赖 ATP 解折叠工作.

另一个重要问题涉及氧化蛋白质通过由 α 亚基 N 端解折叠形成的 20 S 蛋白酶体 α 环的入口门. 正如已经提到的那样, 调节复合物可诱导 20 S 蛋白酶体开口. 然而, 各种报道提示也可能由附加

蛋白质或底物本身来完成. 例如: 疏水肽可促进 α 环通道开口, 富含精氨酸的组蛋白 H3 可加速 20 S 蛋白酶体降解酪蛋白和溶酶体. 因此, 氧化蛋白质进入 20 S 蛋白酶体的简单解释是疏水补丁作为致乱剂扰乱 α 环入口门. 然而, 基本机理也许更复杂, 因为入口门的打开不是解折叠蛋白质的普遍性质.

由此可见, 20 S 蛋白酶体和 26 S 蛋白酶体可泛素依赖和非泛素依赖降解衰老蛋白质、氧化蛋白质或错误折叠的蛋白质. 值得注意的是负责降解一种特异蛋白质的各种途径取决于该蛋白质所遭受的损伤, 如文献表明, 衰老的 CaM 很可能被 26 S 蛋白酶体途径降解, 而氧化的 CaM 可优先被结合 Hsp90 伴侣蛋白的 20 S 蛋白酶体途径降解. 因此体内降解损伤的蛋白质可能涉及各种机理的组合, 这些机理的相对贡献可能取决于损害的种类^[6].

3 降解短寿命调节蛋白

蛋白酶体可非泛素依赖地降解短寿命的调节蛋白, 这些调节蛋白往往在体内起重要的作用, 从下面几个蛋白质降解范例可了解这些降解过程和机理.

3.1 鸟氨酸脱羧酶的降解

鸟氨酸脱羧酶(ODC)是多胺代谢中的第一个调节酶, 对细胞的生长具有重要调节作用, 过量产生与病态显现如肿瘤发生相关. ODC 极不稳定, 半衰期短, 其超常转化率和迅速反应性对快速应答外界刺激具有非常重要的意义^[13]. ODC 是第一个报道的被蛋白酶体非泛素依赖地降解的蛋白质, 但其降解的分子机理仍然不很清楚^[9].

3.1.1 依赖抗酶 1 的 ODC 降解.

ODC 的催化产物多胺(包括腐胺、精脒和精胺)可诱导广泛分布的抗酶 1(AZ1)的形成, 由 AZ1 介导完成 ODC 的降解. AZ1 并不抑制 ODC 的合成, 而是与 ODC 结合生成 ODC-AZ 复合物, 通过 26 S 蛋白酶体促使 ODC 的降解^[14].

体内外实验都显示, AZ1 介导的 ODC 降解不涉及泛素. 已知 ODC 的 C 端(最后 37 个氨基酸)含有依赖 AZ1 的不稳定元素, 结合 AZ1 时, 该信号便暴露, 允许迅速降解 ODC. 值得注意的是, 仅 ODC 与 AZ1 结合是不够的, 还需某种 ODC 水解抑制突变, 才能触发 ODC 加速降解. AZ1 负责增大暴露 ODC C 端, AZ1 作用于 ODC 以增强 ODC 与蛋白酶体结合, 而不提高 ODC 加工率. 有趣的

是, 26 S 蛋白酶体也是在 ODC C 端处开始降解 ODC^[15-22], 而杂交蛋白酶体也可降解 ODC^[23], 这表明单个蛋白质底物降解可涉及几条蛋白酶体通路.

另一个重要问题是 AZ1 依赖的 ODC 降解发生在细胞何处? 药理学抑制蛋白酶体导致 AZ1 和 ODC 在核内积累, 这与蛋白质降解发生在核内一致. 另一方面, 因为 AZ1 在细胞核与细胞质之间穿梭移动, 所以 AZ1 的一个可能作用是护送 ODC 出核到细胞质内降解^[21-22].

3.1.2 AZ1 的其他蛋白质靶点.

许多研究小组报告, 像泛素那样, AZ1 能以不同底物作为降解靶点. 如由骨形态发生蛋白 (BMPs) 诱导的细胞信号可诱导 AZ1 依赖的核蛋白降解, 这些核蛋白包括转录共因子 Smad1 和 SNIP1. 降解涉及 20 S 蛋白酶体的 $\beta 7$ 亚基, 其机理依然未知.

AZ1 也导致细胞周期调节蛋白周期素 D1 降解, 该降解途径不依赖磷酸化途径和泛素化途径. 事实是 AZ1 上调诱导周期素 D1 突变体降解, 无需泛素化. AZ1 也以蛋白酶体依赖和非泛素依赖的方式降解 Aurora A 激酶. 而 Aurora A 激酶相互作用蛋白 1(AURKAPI) 是一种 Aurora A 的负调节因子, 也以非泛素依赖和 AZ1 依赖的方式促进 Aurora A 降解. Aurora A、AURKAPI 和 AZ1 可形成三元复合物, Aurora A 的降解是依赖与 AZ1 相互作用, AURKAPI 的作用很可能是提高 AZ1 对 Aurora A 的亲和力, 因此促进蛋白酶体识别 Aurora A^[6].

3.1.3 NAD(P)H 醌氧化酶抑制 ODC 降解.

除了 AZ1 介导 26 S 蛋白酶体降解 ODC 之外, 也可由 20 S 蛋白酶体以非泛素依赖的方式降解 ODC, 这条途径受 NAD(P)H 醌氧化酶 1(NQO1) 抑制. NQO1 是一种丰富的、利用 NAD(P)H 作为共因子还原各种醌的酶. 直接结合 ODC 时, NQO1 稳定 ODC, 但 NQO1-ODC 复合物受氧化应激或双香豆素的干扰, 双香豆素是 NQO1 的竞争抑制剂, 可恢复 ODC 不稳定的初始状态. 重要的是, 后条途径不依赖 ODC C 端结构域, 而依赖 AZ1 的 26 S 蛋白酶体靶标 ODC 需 C 端结构域. AZ1 不与 NQO1 竞争结合 ODC. 而且, 只有 ODC 单体通过 NQO1 抑制降解途径降解. 在体外, 只有不能成为二聚体的 ODC 突变体易被 20 S 蛋白酶体降解, 而不被 26 S 蛋白酶体降解.

然而, NQO1 不仅结合 ODC, 也可结合 p53 和 p73 α 蛋白, 从而抑制蛋白酶体非泛素依赖地降

解这些蛋白质, 这些结果提示 NQO1 具有调节较广范围底物降解的可能性, 换言之, 内在不稳定的蛋白质除非暂时受到保护, 否则将经历被 20 S 蛋白酶体“自动选择(by default)”降解^[24], 直到它们获得功能构象或装配成功能复合物.

3.2 降解 p21

周期素依赖的激酶抑制因子(cki)p21^{WAF1/CIP1}(简称 p21) 是一种通过不同机理施加正负双向作用的细胞周期调节因子, 在许多组织的细胞周期调节中占据核心地位. p21 由于其生物重要性, 被严格调节. p21 是内在不稳定蛋白质, 被蛋白酶体降解. p21 的降解受磷酸化正负双向调节.

p21 降解可在泛素化之前独立发生. 然而, 在目前所用的各种实验模型中, 泛素依赖和非泛素依赖的 p21 降解的相对贡献仍有差异.

在活细胞内(小)部分 p21 泛素化, 加蛋白酶体抑制剂时泛素化 p21 增多, 这与泛素依赖降解的可能性一致. 在其他设置中一种非泛素化的 p21 突变体(突变体内 6 个内赖氨酸突变为精氨酸, 其 N 端被不支持 N 端泛素化的标签所取代)不像野生型那样不稳定, 至少在测试条件下, 保留了经历调节降解的能力, 并保留了所有被测试的功能特性(抑制能力和被周期素 A/cdk2 复合物磷酸化的能力). 这是支持非泛素依赖降解的有力证据. 值得注意的是质谱分析表明内源性 p21 N 端完全被乙酰化. 由于一个蛋白质的 N 端乙酰化是共转录而被认为是不可逆的, 所以这种修饰排除了 N 端泛素化而负责降解体内大部分 p21 的可能性.

一个重要问题是关于蛋白酶体识别非泛素化 p21 的模式, 以及实际负责降解 p21 的蛋白酶体种类, 答案也许不止一个.

已有报道表明体外 20 S 蛋白酶体和 26 S 蛋白酶体均可降解 p21. 体内实验显示, p21 的 C 端直接与 20 S 蛋白酶体的 $\alpha 7$ (C8) 亚基相互作用, 而体外纯化的 26 S 蛋白酶体降解重组 p21 无需这种相互作用. 然而, 这种相互作用有助于 20 S 蛋白酶体降解 p21, 证据有 4 点: a. 缺失 C 端结构域的 p21 突变体在体内稳定, 而具有增大 $\alpha 7$ 亲和力的 p21 被加速降解; b. 在体外, 野生型 p21 是纯化 20 S 蛋白酶体的底物, 缺失 C 端的 p21 突变体不是纯化 20 S 蛋白酶体的底物; c. Mdm2 加速降解 p21 和促进 p21 结合 $\alpha 7$ 密切相关; d. 小 GTPase Ras 的癌基因活性通过促进形成 p21- 周期素 D1 复合物来稳定 p21, 这既可阻止蛋白酶体降

解 p21, 又可减弱 p21 与 $\alpha 7$ 结合^[13].

如果 p21 在体内易成为 20 S 蛋白酶体的底物, 就需解释 p21 如何找到进入 20 S 蛋白酶体水解腔的通路, 因为该水解腔入口由 α 亚基柔韧的 N 端把守. 第一种可能如衰老 / 变性 / 氧化蛋白质中讨论的那样, 由于 p21 结构性差, 自身可促使 α 环通道开口. 至于 26 S 蛋白酶体降解 p21, 体外研究显示无需 ATP, 有人认为天然无序蛋白质底物可通过被动扩散穿过开孔进入蛋白酶体水解腔.

总之, p21 可经历泛素依赖和非泛素依赖的降解. 然而各种降解 p21 机理的各自贡献仍需阐明.

3.3 降解 c-Fos 和 Fra-1 转录因子

c-Fos 原肿瘤蛋白定义为关键细胞调节因子的多基因家族, 包括 c-Fos 和 Fra-1, 统称为 Fos 蛋白. Fos 蛋白都是内在不稳定蛋白, 其降解性表达与各种病理学相关, 尤其与癌症相关. 许多细胞内的信号级联系统聚集于 c-Fos 和 Fra-1, 可协同影响各种调节水平^[25].

3.3.1 降解 c-Fos.

c-Fos 是 Fos 家族中最佳的降解研究成员. c-Fos 在胚胎组织和成人体内组织以及各种增生肿瘤和细胞系中结构性表达. 通常 c-Fos 可被快速短暂地诱导表达, 其半寿命仅在小时范围内. 在各种体内条件下, 虽然其他水解系统可能有微小的贡献, 但主要由蛋白酶体降解 c-Fos. c-Fos 在细胞核中占优势时, 大部分 c-Fos 被蛋白酶体以非泛素依赖的方式降解; 在某些特殊信号条件下 c-Fos 位于细胞质内, 小部分 c-Fos 被蛋白酶体以泛素依赖的方式加速降解, 并涉及 UBR1 E3 连接酶^[25-26].

c-Fos 包含 2 个去稳定结构域, 一个位于 N 端, 另一个位于 C 端. c-Fos 在细胞质内时其 N 端去稳定结构域控制泛素依赖的降解, 在细胞核内时控制非泛素依赖的降解. C 端去稳定结构域仅涉及非泛素依赖的 c-Fos 降解. c-Fos 的降解受位于两端的自主去稳定因子差异调节. 在异步生长和 G0/G1 转变期内, c-Fos C 端去稳定因子都有功能, 而 N 端去稳定因子仅在 G0/G1 转变期内活化^[26]. 然而, 在重新进入细胞周期的细胞内或表达癌基因 Ras 或 Mos 蛋白的细胞内两关键丝氨酸被 Erk1/2 和 Rsk1/2 磷酸化时 c-Fos 活性明显降低.

3.3.2 降解 Fra-1.

Fra-1 半寿命在 1 h 内, 仅包含 C 端去稳定结构域. 在低 ERK1/2 活性或低 ERK5 活性的条件下, Fra-1 内在不稳定. 在这些情况下, Fra-1 降解

取决于包含在 C 端 30~40 个氨基酸内的单个去稳定结构域, 而 C 端 30~40 个氨基酸是所有 Fos 蛋白之间高度保守结构域. 这有力地提示所有 Fos 蛋白的降解机理如果不是完全一致, 也是相似的. 所以, Fra-1 像 c-Fos 那样, 是被蛋白酶体以非泛素依赖的方式降解^[27].

总之, c-Fos 可受到多种蛋白酶体降解途径降解, 反之, 目前发现 Fra-1 只有一条降解途径. 在核内积累的情况下, 大部分 c-Fos 和 Fra-1 受到蛋白酶体非泛素依赖地降解^[26].

3.4 降解 p53 肿瘤抑制蛋白

p53 蛋白是调控人体内细胞生长最重要的分子之一, 它是机体对抗癌细胞失控生长的主要防线之一. 超过 50% 的人类癌症伴随 p53 蛋白突变或失去功能.

蛋白质转化控制在 p53 功能调节中起关键作用. 在非应激细胞内, p53 通常以不稳定的、潜伏的和低丰度 (poorly abundant) 的形式存在. 在应激细胞内, p53 稳定且有转录活性. 已报道, p53 可泛素依赖和非泛素依赖地降解^[7].

最近有文献提示, 多达 20% 的细胞蛋白质可被 20 S 蛋白酶体在非结构域降解或剪切^[7, 11, 27], 相似地, N 端和 C 端非结构的 p53 也可被 20 S 蛋白酶体以非泛素依赖的方式降解^[11, 27].

NQO1 可阻止 20 S 蛋白酶体非泛素依赖地降解 p53. 大部分 NQO1 特异地与 20 S 蛋白酶体结合, 不与 26 S 蛋白酶体结合, NQO1 也能结合 p53, 是以依赖 NADH 的方式与 p53 结合. 双香豆素和 NQO1 的其他竞争抑制剂与 NADH 竞争结合 NQO1, 导致 NQO1-p53 复合物解离. 这些抑制剂存在时, p53 变得高度不稳定, 倾向于被蛋白酶体降解.

NADH 调节 NQO1 与潜在的 20 S 蛋白酶体底物结合, 但不控制 NQO1 与 20 S 蛋白酶体结合. NADH 高水平时, 底物受保护, 不进入 20 S 水解腔, 低水平时, 底物不被有效保护, 被蛋白酶体降解. 该模型解释了某些与 NADH 竞争的小分子药物如双香豆素使 p53 降解敏感性增大的原因^[7].

NQO1 与 20 S 蛋白酶体结合的发展和 NQO1 防止具有非结构域的蛋白质如 p53、p73 和 ODC 被 20 S 蛋白酶体降解的发现, 是与 NQO1 起着 20 S 蛋白酶体“看门人”作用的模型一致^[7]. 也就是说, 除非受到诸如 NQO1 那样的稳定因子保护, 短寿命的、非结构的细胞蛋白质将被 20 S 蛋白酶

体“自动选择”降解^[7,9,24]。

最新的证据表明泛素依赖的降解是降解 p53 的主要途径。然而，非泛素依赖机理也对 p53 降解作贡献。一方面，20 S 蛋白酶体构成了非泛素依赖的“自动选择”降解途径，该途径可与著名的 Mdm2 依赖途径和泛素依赖途径共存。另一方面，在 HPV16/18 感染细胞内，病毒 E6 蛋白允许与 E6-AP 泛素 E3 连接酶结合。这就导致以泛素依赖为主要方式、以非泛素依赖为次要方式加速蛋白酶体降解 p53。

3.5 降解 HIF-1 转录因子

低氧诱导因子 1(HIF-1)是诱导低氧基因和修复细胞氧内环境的核心调节因子，其转录复合物在细胞适应缺氧时和供氧时起极其重要的作用。这样的适应在实体瘤内尤为重要，因为实体肿瘤内部广泛存在着缺氧现象，所以 HIF-1 成为治疗人类恶性肿瘤的很好靶点。

HIF-1 以异源二聚体形式存在，由 α 、 β 两个亚基构成，其中 HIF α 是诱导型表达亚基，也是主要的功能亚基，受多种因素的调控，其亚单位有 3 种，分别为 HIF-1 α 、HIF-2 α 和 HIF-3 α 。在低氧条件下，HIF-1 被蛋白酶体以泛素依赖方式迅速降解，这就解释了 HIF-1 低丰度的原因。氧诱导的 HIF-1 α 降解受其与肿瘤抑制蛋白 VHL 相互作用的介导，VHL 蛋白充当多聚体 E3 连接酶的结合底物。除了这条常氧条件下运行的主要降解途径之外，有两种 HIF α 属于蛋白酶体非泛素依赖地降解的情况，一种是在慢性低氧期间 HIF α 结构性降解，另一种是被组蛋白乙酰转移酶抑制剂去稳定。

通过氧利用调节蛋白酶体非泛素依赖地降解 HIF-1 α 。在常氧条件下，HIF-1 α 不稳定、低氧化的脯氨酸(P402 和 P564)触发 HIF-1 α 加速降解，这两种脯氨酸位于 ODD 区域内。羟基化脯氨酸被 VHL 蛋白所识别。在慢性低氧条件下，HIF-1 α 从属于半寿命为 2~4 h 的基本转化，其蛋白酶体降解需完整 ODD。然而，脯氨酸羟基化不被 VHL 所识别，羟基化脯氨酸选择蛋白酶体也不需要泛素化。

在存在 HDAC 抑制剂时 HIF-1 α 不稳定。在标准条件下，HIF-1 α 适当折叠需要 Hsp70 和 Hsp90 伴侣相继作用。HDACs 受抑制时，Hsp90 乙酰化，这抑制了 Hsp90 的活性。Hsp70/Hsp90 轴线的相互断裂导致新合成的 HIF-1 α 选择蛋白酶体，被蛋白酶体非泛素依赖地降解。

总之，HIF-1 α 本质上是稳定蛋白质，在常

氧条件下加速降解，生理加速降解依赖于蛋白酶体和泛素，基本转化不需要蛋白酶体降解的蛋白质泛素化。这提示了其他蛋白酶体底物的情况，例如，TNF α 诱导的转录抑制剂 I κ B α 的降解依赖于泛素化，而基本降解不依赖泛素。这或许也是 c-Jun 转录因子的情况，c-Jun 转录因子在体内经历泛素依赖的降解，但是在体外，是纯化的 26 S 蛋白酶体的极其敏感底物，在较少程度上是 20 S 蛋白酶体的底物^[9]。

由此可知，某些重要调节蛋白的降解通路往往不止一条，走泛素依赖通路降解还是走非泛素依赖通路降解，依其生理或病理状态而定。

4 蛋白酶体非泛素依赖地降解蛋白质机理又一新进展——REG γ 的作用

敲除 REG γ 的小鼠实验显示，缺失 REG γ 导致小鼠身体体积减小及细胞特异的有丝分裂缺陷，提示 REG γ 具有调节细胞生长和繁殖的作用。缺失 REG γ 的鼠胚胎成纤维细胞(MEFs)显示细胞周期从 G1 期切换到 S 期较慢，在缺失 REG γ 的果蝇细胞内也观察到相似的结果，提示 REG γ 在细胞周期调节中的保守功能。此外，REG γ 涉及凋亡的调节。与野生型的 MEFs 相比，缺失 REG γ 的 MEFs 凋亡水平明显提高。已发现 REG γ 对凋亡的调节与其磷酸化有关，上游激酶负责 REG γ 的磷酸化。磷酸化后 REG γ 还有其他功能，例如磷酸化涉及 REG γ -蛋白酶体对底物的特异性。REG γ 的磷酸化提供了一种 REG γ 调节机理，通过该机理细胞内信号可激活依赖 REG γ 的蛋白酶体^[9]。

新近发现，REG γ 不仅刺激 20 S 蛋白酶体降解短肽底物，而且靶标蛋白酶体降解完整细胞蛋白质，例如 REG γ 靶标降解的 p21、p16 和 p19。但是，完整蛋白质如何解折叠并以非 APT 依赖方式转入 20 S 蛋白酶体还知之甚少。已知 20 S 蛋白酶体具有蛋白质内切酶水解活性，因此推测 REG γ 促进蛋白酶体降解非结构的内肽键或促使天然解折叠蛋白质进入 20 S 蛋白酶体，这一进入过程不需 ATP。

已发现 REG γ 是半胱天冬酶 7 的结合蛋白。在体内外，半胱天冬酶 3 和半胱天冬酶 7 可直接剪切 REG γ ，然而，凋亡期间剪切 REG γ 的功能意义还有待阐明^[9]。

研究显示，REG γ 在甲状腺癌和结肠直肠癌中高度表达，在结肠癌和扩散性癌中表达增高，提示 REG γ 在癌病变的所有时期内起重要作用。例如，

REG γ 可以非泛素依赖的方式激活蛋白酶体降解致瘤蛋白 SRC-3, 而 SRC-3 常在激素敏感肿瘤如乳腺癌、前列腺癌和卵巢癌以及非激素依赖的肿瘤如胰腺癌和胃癌中过度表达. REG γ 也能以非泛素依赖的方式降解肿瘤抑制因子如 p21、p16 和 p19^[26], 还能以非泛素依赖的方式降解其他致瘤蛋白如肝炎 C 病毒的核心蛋白^[8], 也有研究显示, REG γ 通过泛素依赖和非泛素依赖两种方式调节降解肝炎 C 病毒的核心蛋白, 从而不仅涉及该病毒病理发生也涉及其增殖^[28].

因此, 研究表明 REG γ -蛋白酶体降解靶蛋白的过程不依赖于泛素化. 下面 3 个范例展示了该过程及其机理.

4.1 降解 SRC-3/AIB1 转录共激活因子

甾体受体共激活因子 3(SRC-3/AIB1)属于转录共因子的 SRC 家族(包括 SRC-1 和 SRC-2), 这些共激活因子与甾体受体相互作用, 提供受体依赖的转录. SRC-3 在若干人乳腺癌中扩增, 充当一种癌基因.

SRC-3 的降解被调节. 几项研究已表明 SRC-3 降解中涉及蛋白酶体, 并提出泛素途径的贡献. 然而, Li 等^[29]的工作显示 SRC-3 可被 REG γ 介导的 20 S 蛋白酶体以非泛素和非 ATP 依赖的方式降解. 免疫沉淀实验鉴定出 REG γ 可作为 SRC-3 的相互作用物, 而不作为与 SRC-1、SRC-2 和雌激素(ER)的相互作用物, 显示 REG γ 对 SRC-3 的特异性. 两项主要证据确定 REG γ 在 SRC-3 降解中的作用. a. 在活细胞内 REG γ 过表达加速 SRC-3 降解, 而应用 RNAi 抑制 REG γ 表达, 导致 SRC-3 较高积累. b. 基于纯化的 20 S、REG γ 和 SRC-3 重组分析显示, SRC-3 降解是非 ATP 和非泛素依赖的. 而用 REG α/β 调节复合物取代 REG γ 不促进 SRC-3 降解; 在平行试验中没观察到 REG γ 刺激降解 SRC-1, 也不刺激降解 ER, 表明这种降解具有特异性^[29]. 这是首次发现 REG γ 可以介导 20 S 蛋白酶体降解完整的蛋白质分子, 改变了以往认为 REG γ -20 S 蛋白酶体只能降解短肽的观念.

含有 REG γ 的蛋白酶体复合物如何识别并加工 SRC-3? SRC-3 存在两个高度结构化的区域: N 端范围内的 bHLH-PAS 结构域, 接近 C 端的组蛋白乙酰转移酶结构域(HAT), HAT 负责结合 REG γ . 除此之外, 预测 SRC-3 内部序列是拥有长环的无序序列. 而且, 末端的氨基端和羧基端也是非结构的. 因此推测其降解机理为: HAT 结构域介导

REG γ -20 S 蛋白酶体复合物识别 SRC-3, 然后 SRC-3 的天然无序结构域进入 20 S 蛋白酶体的水解腔内. 优先靶标是 SRC-3 的内部无序结构域还是末端无序结构域仍有待阐明. 这些内部位点的初始水解之后蛋白酶体也能渐进地、双向地降解 SRC-3.

值得注意的是, SRC-3 水解产物还没有定性, 因此, 仍需确定 REG γ -20 S 蛋白酶体复合物是否能够完全降解 SRC-3, 包括有结构的 bHLH-PAS 和 HAT 结构域. 可能是具有 19 S 的蛋白酶体复合物接管把 SRC-3 还原为氨基酸或寡肽. 否则, 将提出有趣的机理问题, 例如: a. 与 19 S 调节因子相反, REG γ 没有任何伴侣活性; b. 据报道在几种情况下紧密折叠的结构可阻止完整蛋白质降解. 因此 Li 等^[29]推测, SRC-3 和 REG γ 之间初步相互作用之后, REG γ 作为一种棘齿防止底物倒转退出 20 S 蛋白酶体, 这一过程无需 ATP, 由同时存在的肽水解酶提供游离能量有效降解 SRC-3.

4.2 降解 p21

最近研究指出, 至少在某些细胞环境内, 含有 REG γ 调节因子的蛋白酶体复合物对降解大部分 p21 作主要贡献. 应用各种探索证实, 在 REG γ 过表达的细胞内 p21 明显减少, 反之, 在 REG γ 失活的细胞内 p21 表达水平不变或增高. 而且, 在被 RNAi 敲除 REG γ 的细胞内和来自 REG γ KO 鼠胚胎成纤维细胞内 p21 显示稳定. 应用无细胞纯化组分降解则证实 REG γ 在 p21 降解中起直接作用, 且 p21 降解不需 ATP 和泛素化^[30-31], 并证实是 20 S 蛋白酶体而不是 26 S 蛋白酶体降解 p21^[30]. 应用泛素活化酶温度敏感细胞(ts85)也证实了 REG γ 介导的蛋白酶体降解 p21 不需泛素^[31]. p21 突变体分析揭示含有 REG γ 调节因子的蛋白酶体复合物在一定程度上特异识别和处理底物, 位于蛋白质的 C 端结构域内的组分具有关键作用. 但某些细胞系内的 p21 降解不需要 REG γ , 敲除 REG γ 的细胞并非完全废除蛋白酶体非泛素依赖地降解 p21. 这表明其他蛋白酶体也可处理 p21. 这些事实也提示, REG γ 依赖的降解似乎有细胞种类特异性, 此外, 并非所有细胞环境下都行使 REG γ 介导降解 p21 途径, 也可能同时存在其他蛋白酶体非泛素依赖地降解 p21 的机理.

4.3 降解泛素连接酶 Smurf1

泛素连接酶 Smad 泛素化调节因子 1(Smurf1)是 E6AP C 端(HECT)结构域型泛素蛋白连接酶(E3)

的同源物, 通过靶标 BMP-Smad、wnt、RhoA 信号蛋白泛素化, 使这些底物被 26 S 蛋白酶体降解, 从而在骨稳态维持、细胞极性控制和胚胎发育调节中发挥关键作用. 与 Smurf1 介导底物泛素化降解相反, Smurf1 本身被发现是通过 REG γ 介导被 20 S 蛋白酶体以非泛素和非 ATP 依赖的方式降解. 研究显示, Smurf1 在体内外均能与 REG γ 相互作用, 敲除 REG γ , 可稳定 Smurf1, 而 REG γ 过表达, 可促进 Smurf1 降解, REG γ 不改变 Smurf1 的 mRNA 表达水平. 体外实验表明, 将纯化的 REG γ 或纯化的 20 S 蛋白酶体单独与纯化的 Smurf1 孵育, 均不会明显影响 Smurf1 水平. 反之, 在无泛素和 ATP 的条件下将纯化的 REG γ 、20 S 蛋白酶体与 Smurf1 共孵育, 可导致 Smurf1 急剧降解, 表明 REG γ 诱导 20 S 蛋白酶体以非泛素和非 ATP 依赖的方式降解 Smurf1^[8].

令人惊奇的是, REG γ 也可促进 Smurf1 的底物 Smad5 降解, 而且, REG γ 和 Smurf1 具有协同调节 Smad5 的功能. 因为应用 siRNA 敲除内源性 Smurf1, REG γ 就丧失促进 Smad5 降解的功能. 此外, 在细胞内引入 Smurf1 前检测不到 REG γ 与 Smad5 之间的相互作用. Smurf1、Smad5 和 REG γ 可形成三重复合物, 通过这一复合物, Smurf1 招募 Smad5 被 REG γ -蛋白酶体降解. 研究还发现, REG γ 急剧下调 Smad1/3/5, 不能改变 Smad4 的蛋白质水平. 研究也提示, Smurf2 是以类似于 Smurf1 的降解方式被 REG γ -蛋白酶体降解. 需要注意的是, REG γ -蛋白酶体主要位于细胞核内, Smurf1 蛋白能穿梭在细胞核与细胞质之间, Smad1/5 也可像 Smurf1 那样穿梭在细胞核与细胞质之间^[8].

不仅 SRC3、p21 和 Smurf1 是 REG γ -蛋白酶体的靶点, 而且其他蛋白质也可被 REG γ -蛋白酶体直接降解, 垂体瘤转化基因 1 的蛋白质产物 (PTTG1) 就是典型例子. PTTG1 能与甲状腺激素 β 受体 (TR β) 结合, 随后在甲状腺激素 T3 与 TR β 结合时去稳定. T3 与 TR β 结合促进 TR β 与 SRC3 相互作用, 导致形成 T3-liganded TR β /PTTG1/SRC3/REG γ 复合物, 随后被 PTTG1 蛋白酶体降解.

REG γ 途径介导降解的蛋白质正在被陆续发现, 其他比较著名的范例有 p16 和 p14 等.

我们通过酵母双杂交体系已发现一系列 REG γ 结合蛋白. 后续研究已发现 REG γ 介导蛋白酶体非泛素依赖地降解其中部分蛋白质. 如 REG γ 可介导

蛋白酶体降解某些氧化损伤蛋白质; 又如发现 REG γ 主要通过促进 p53 蛋白单泛素化、出核和胞质中降解的途径在人类细胞中对 p53 蛋白进行调节. p53 蛋白单泛素化将显著加强 p53 与 HDM2 蛋白间的相互作用. 此外, REG γ 减弱 p53 蛋白的四聚体化, 从而进一步促进 REG γ 介导的 p53 蛋白的出核并减弱其在转录中的作用. 通过敲除 REG γ 基因使得细胞在受到细胞毒药物诱导后更容易发生凋亡, 也证实了 REG γ 在调控 p53 蛋白上的作用^[32].

目前, REG γ 途径对降解蛋白质的选择是否有规律依然不甚清楚, 一种可能性是 REG γ 途径专为蛋白酶体降解非结构蛋白质, 如 p19、p21 和 p16 不与特异结合伴侣结合时都为非结构. 但有资料不支持这一假说, 如 p27 不与细胞周期素和 Cdk 相结合时也为非结构, 但转化是严格泛素依赖, 不受 REG γ 调节. 而且, 虽然单体 p21 为非结构, 但体内大部分 p21 在 p21-细胞周期素-Cdk 复合物内有高度特定结构. 因此有研究人员提出, 与一般解折叠结构完全不同, 特异基序 (motif) 是底物被 REG γ 识别所必需^[30].

被 REG γ 途径靶标的另一类特异蛋白质是缺少赖氨酸残基的蛋白质, 如 p16 和人 p14^{Arf} 是天然缺少赖氨酸残基的蛋白质, 在真核细胞蛋白质库内另有 100 多个缺少赖氨酸的蛋白质. 因此, REG γ 途径可提供允许蛋白酶体降解缺少赖氨酸残基蛋白质的非泛素依赖的机理. 病毒蛋白质构成一大类天然缺少赖氨酸残基的蛋白质, 这就提高了 REG γ 途径对控制病毒发病机理极其重要的可能性^[30].

REG γ 是唯一的在非泛素和非 ATP 依赖的核蛋白降解进程中具有多样复杂作用的生物分子, 这些功能可对许多病理发展如癌症、病毒疾病和神经退行性疾病作贡献. 至今, REG γ 的生物功能依然没有搞清楚, 但已发现的功能与重要的细胞过程密切相关.

目前已发现了 REG γ -蛋白酶体的多种靶蛋白, 而这些蛋白质对细胞周期 / 肿瘤发生发展的调控起着重要的作用. 这些研究结果都进一步揭示了 REG γ 介导的降解通路的生物学意义.

5 总结与展望

虽然细胞内许多蛋白质选择性降解是依赖泛素-26 S 蛋白酶体途径^[3, 33], 但最近发现, 一些重要调节蛋白和氧化蛋白以及衰老蛋白可被蛋白酶体非泛素依赖地降解, 除上述介绍的多个典型蛋白质

外, 还发现 Rb 肿瘤抑制蛋白(Rb 肿瘤抑制蛋白是多基因家族的成员, 这些蛋白质在各种细胞过程中起关键作用)^[34]、KLF5 转录因子(KLF5 是 Kruppel 样的调节细胞增殖、分化、细胞周期、凋亡和血管再生的锌指转录因子)^[35]、tau 蛋白(在几种神经退行性疾病如阿兹海默氏症中 tau 蛋白以超磷酸化形式积累)^[36]、肝炎 B 病毒 X 蛋白质(多功能病毒调节蛋白, 具有广泛的基因转录调控作用, 并能与宿主细胞的多种蛋白质直接作用, 从而调节基因表达及宿主细胞蛋白质功能)^[37]、肌钙蛋白 C(肌钙蛋白是横纹肌中起主要调节作用的蛋白质, 由 T、I、C 三个亚基构成, 肌钙蛋白 C 是 Ca^{2+} 结合亚基)^[38]、FAT10 (小泛素样的调节因子)^[39]、人胸苷酸合成酶(催化 dUMP 甲基化为 dTMP)^[40]、鼠细小病毒 NS2 蛋白(病毒颗粒的装配和释放所必需的一种蛋白质)^[34]、I κ B α (NF- κ B 天然抑制调节因子, 对 NF- κ B 产生负反馈调节效应)^[34]等众多蛋白质被蛋白酶体非泛素依赖地降解。越来越多的实验证据表明非泛素依赖地降解蛋白质比推测的更普遍^[38]。这些蛋白质主要是被 20 S 蛋白酶体非泛素依赖地降解, 其中 REG γ 可介导 20 S 蛋白酶体非泛素依赖地降解一些蛋白质。26 S 蛋白酶体也可非泛素依赖地降解蛋白质, 如降解 ODC、钙调蛋白、c-Jun 和肌钙蛋白 C^[9]。有些蛋白质既可被 26 S 蛋白酶体泛素依赖地降解, 也可被 20 S 蛋白酶体非泛素依赖地降解, 如 p21 和 p53。降解过程中, 有需要 ATP 的, 也有无需 ATP 的。蛋白酶体非泛素依赖地降解蛋白质的前提是选择性识别蛋白质, 迄今为止提出的特征底物有多种: 构象重排并暴露疏水补丁的蛋白质、天然解折叠的蛋白质、具有非结构域的蛋白质、缺少赖氨酸残基的蛋白质、具有无序结构域的蛋白质和特异基序的蛋白质。AZ1 和 Mdm2 等伴侣促使蛋白酶体选择性识别底物。这些研究都提示蛋白酶体非泛素依赖地降解蛋白质有多条途径, 多种机理, 尚未发现一种共同的机理。这些发现开阔了我们对蛋白质降解的认识, 同时也给蛋白酶体非泛素依赖地降解蛋白质机理研究带来新挑战。

由于细胞内蛋白质非泛素依赖降解事件的发生会调节许多生命过程, 如细胞增殖、分化和衰老。因此细胞内蛋白质非泛素依赖降解调控异常也会引发多种疾病, 包括癌症、病毒疾病和神经退行性疾病^[5]。该领域的研究会引起越来越广泛的兴趣。全面揭开蛋白酶体非泛素依赖地降解蛋白质的面纱将会为开发和利用相关药物提供指导, 可更有效地治

疗相关疾病。

虽然对蛋白酶体非泛素依赖地降解蛋白质的研究已经取得一定成果, 但最近文献指出了蛋白酶体非泛素依赖地降解蛋白质的作用长期受到低估^[6]。另一方面, 该研究还有很多问题没有解决, 全面解读该过程还需要更多的努力和探索。

参 考 文 献

- [1] Germain D. Ubiquitin-dependent and -independent mitochondrial protein quality controls: implications in ageing and neurodegenerative diseases. *Molecular Microbiology*, 2008, **70**(6), 1334-1341
- [2] Knecht E, Aguado C, Ca'rcel J, *et al.* Intracellular protein degradation in mammalian cells: recent developments. *Cell Mol Life Sci*, 2009, **66**(15): 2427-2443
- [3] Martinez-Vicente M, Sovak G, Ana A M. Protein degradation and aging. *Experimental Gerontology*, 2005, **40**(8-9): 622-633
- [4] Jung T, Catalgol B. The proteasomal system. *Molecular Aspects of Medicine*, 2009, **30**(4): 191-296
- [5] Mao I, Liu J, Li X, *et al.* REG γ , a proteasome activator and beyond?. *Cell Mol Life Sci*, 2009, **65**(24): 3971-3980
- [6] Jariel-Encontre I, Bossis G, Piechaczyk M. Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim Biophys Acta*, 2008, **1786**(2): 153-177
- [7] Tsvetkov P, Reuven N, Shaul Y. Ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation. *Cell Death and Differentiation*, 2010, **17**(1): 103-108
- [8] Nie J, Wu M, Wang J. REG γ proteasome mediates degradation of the ubiquitin ligase Smurf1. *FEBS Letters*, 2010, **584**(14): 3021-3027
- [9] Orlowski M, Wilk S. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys*, 2003, **415**(1): 1-5
- [10] Benaroudj N, Tarcsa E, Cascio P, *et al.* The unfolding of substrates and ubiquitin-independent protein degradation by proteasomes. *Biochimie*, 2001, **83**(3-4): 311-318
- [11] Brooks P, Fuentes G, Murray R Z, *et al.* Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem J*, 2000, **346**(Pt 1): 155-161
- [12] Kelvin J A. Davies. Degradation of oxidized proteins by the 20 S proteasome. *Biochimie*, 2001, **83**(3-4): 301-310
- [13] Tsuji T, Todd R, Meyer C, *et al.* Reduction of ornithine decarboxylase antizyme (ODCAz) level in the 7, 12-dimethylbenz (a)anthraceneinduced hamster buccal pouch carcinogenesis model. *Oncogene*, 1998, **16**(26): 3379-3385
- [14] Choi K S, Suh Y H, Kim W H, *et al.* Stable siRNA-mediated silencing of antizyme inhibitor: regulation of ornithine decarboxylase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **328**(1): 206-212
- [15] Elias S, Bercovich B, Kahana C, *et al.* Ciechanover, Degradation of ornithine decarboxylase by the mammalian and yeast 26 S proteasome complexes requires all the components of the protease.

- Eur J Biochem, 1995, **229**(1): 276–283
- [16] Murakami Y, Matsufuji S, Hayashi S I, *et al.* ATP-dependent inactivation and sequestration of ornithine decarboxylase by the 26 S proteasome are prerequisites for degradation. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**(10): 7216–7227
- [17] Zhang M, Pickart C M, Coffino P. Determinants of proteasome recognition of ornithine decarboxylase, a ubiquitin-independent substrate. *Embo J*, 2003, **22**(7): 1488–1496
- [18] Li X, Coffino P. Degradation of ornithine decarboxylase: exposure of the C-terminal target by a polyamine-inducible inhibitory protein. *Mol Cell Biol*, 1993, **13**(4): 2377–2383
- [19] Chen H, MacDonald A, Coffino P. Structural elements of antizymes 1 and 2 are required for proteasomal degradation of ornithine decarboxylase. *J Biol Chem*, 2002, **277**(48): 45957–45961
- [20] Zhang M, MacDonald A I, Hoyt M A, *et al.* Proteasomes begin ornithine decarboxylase digestion at the C terminus. *J Biol Chem*, 2004, **279**(20): 20959–20965
- [21] Gritli-Linde A, Nilsson J, Bohlooly Y M, *et al.* Nuclear translocation of antizyme and expression of ornithine decarboxylase and antizyme are developmentally regulated. *Dev Dyn*, 2001, **220**(3): 259–275
- [22] Murai N, Murakami Y, Matsufuji S. Identification of nuclear export signals in antizyme-1. *J Biol Chem*, 2003, **278**(45): 44791–44798
- [23] Tanahashi N, Murakami Y, Minami Y, *et al.* Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J Biol Chem*, 2000, **275**(19): 14336–14345
- [24] Asher G, Reuven N, Shaul Y. 20 S proteasomes and protein degradation "by default". *BioEssays*, 2006, **28**(8): 844–849
- [25] Basbous J, Jariel-Encontre I, Gomard T, *et al.* Ubiquitin-independent- versus ubiquitin-dependent proteasomal degradation of the c-Fos and Fra-1 transcription factors: Is there a unique answer?. *Biochimie*, 2008, **90**(2): 296–305
- [26] Gomard T, Jariel-Encontre I, Basbous J, *et al.* Fos family protein degradation by the proteasome. *Biochem Soc Trans*, 2008, **36**(Pt5): 858–863
- [27] Baugh J M, Viktorova E G, Pilipenko E V. Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *J Mol Biol*, 2009, **386**(3): 814–827
- [28] Moriishi K, Shoji I, Mori Y, *et al.* Involvement of PA28 γ in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology*, 2010, **52**(2): 411–420
- [29] Li X T, Lonard D L, Jung S Y, *et al.* The SRC-3/AIB1 Coactivator is degraded in a ubiquitin- and ATP-independent manner by the REG γ proteasome. *Cell*, 2006, **124**(2): 381–392
- [30] Chen X Y, Barton L F, Chi Y, *et al.* Ubiquitin-independent degradation of cell-cycle inhibitors by the REG γ proteasome. *Molecular Cell*, 2007, **26**(6): 843–852
- [31] Li X T, Amazit L, Long W W, *et al.* Ubiquitin- and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REG γ -proteasome pathway. *Molecular Cell*, 2007, **26**(6): 831–842
- [32] Liu J, Yu G, Li X T, *et al.* REG γ promotes cancer development by inactivating the tumor suppressor p53. *J Cell Sci*, 2010, **123**(Pt23): 4076–4084
- [33] 何珊, 张令强, 贺福初. 类泛素化修饰 Neddylation 的功能和调控机制研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(9): 1089–1094
- He S, Zhang L Q, He F C. *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(9): 1089–1094
- [34] Kalejta R F, Shenk T. Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of the Rb family of tumor suppressors by the human cytomegalovirus pp71 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(6): 3263–3268
- [35] Chena C, Zhoua Z M, Guo P, *et al.* Proteasomal degradation of the KLF5 transcription factor through a ubiquitin-independent pathway. *FEBS Letters*, 2007, **581**(6): 1124–1130
- [36] Grune T, Botzen D, Engels M, *et al.* Tau protein degradation is catalyzed by the ATP/ubiquitin-independent 20 S proteasome under normal cell conditions. *Arch Biochem Biophys*, 2010, **500**(2): 181–188
- [37] Kim J H, Sohn S Y, Yen T S B, *et al.* Ubiquitin-dependent and -independent proteasomal degradation of hepatitis B virus X protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **366**(4): 1036–1042
- [38] Benaroudj N, Tarcsa E, Cascio P, *et al.* The unfolding of substrates and ubiquitin-independent protein degradation by proteasomes. *Biochimie*, 2001, **83**(3–4): 311–318
- [39] Hipp M S, Kalveram B, Raasi S, *et al.* FAT10, a Ubiquitin-independent signal for proteasomal degradation. *Mol Cell Biol*, 2005, **25**(9): 3483–3491
- [40] Pena M M, Xing Y Y, Koli S, *et al.* Role of N-terminal residues in the ubiquitin-independent degradation of human thymidylate synthase. *Biochem J*, 2006, **394**(Pt1): 355–363

The Research Advances in Ubiquitin-independent Degradation of Proteins

CHEN Ji-Wu^{**}, ZUO Qiu-Hong, JI Lei, LI Xiao-Tao

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract How the proteins are recognized and selectively degraded in the cellular life process is an important scientific question. The general mode of selective degradation of proteins in the cell in ATP- and ubiquitin-dependent pathway has been well studied. However, little attention has been directed toward the possible involvement of the proteasome in ubiquitin-independent proteolysis. In the past few years, many publications have provided evidence that the proteasome can degrade some proteins in a ubiquitin-independent manner. This pathway is involved in the elimination of some short-life regulated proteins, misfolded proteins, aged proteins and oxidized proteins as well as "quality control" of newly synthesized proteins, and involved in pathological processes such as cancer and neurodegenerative diseases. Therefore, it plays important roles in physiology and pathology. Some representative proteins degraded by the proteasome in a ubiquitin-independent manner in the past decade or two were summarized with focuses on their molecular mechanisms and the selected cases as examples to provide an overview of the field.

Key words proteasome, ubiquitin-independent, degradation of proteins, REG γ

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00569

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30870503, 81071657, 30811120435).

****Corresponding author.**

Tel: 86-21-62233547, E-mail: jwchen@bio.ecnu.edu.cn

Received: November 5, 2010 Accepted: February 14, 2011