

泛素特异性蛋白酶46的分子克隆及 基因突变对其功能的影响

张景坤¹ 张 玮^{2*} 魏 群³ 祁素芬⁴ 秘迎君⁴ 贾 媛⁵ 吕红芝⁶ 赵 静⁷ 刘淑霞²

(¹河北医科大学, 国际教育学院, 石家庄 050017; ²河北医科大学, 病理教研室, 石家庄 050017; ³河北省人民医院, 感染管理科, 石家庄 050000; ⁴河北医科大学, 流行病与卫生统计学教研室, 石家庄 050017; ⁵河北医科大学第二医院, 感染管理科, 石家庄 050000; ⁶河北医科大学第三医院, 河北省骨科研究所, 石家庄 050051; ⁷河北医科大学, 中西医结合学院药理学教研室, 石家庄 050017)

摘要 该文探讨了行为绝望相关基因——泛素特异性蛋白酶46(*usp46*)基因的生物学功能及编码区错义突变对其功能的影响。从人类食管癌细胞株TE-1中提取总RNA, RT-PCR扩增获得人类*usp46*基因, qRT-PCR检测小鼠各组织中该基因的mRNA相对表达水平; 运用去泛素化酶活性检测体系, 将USP46与模型底物表达质粒共转化, 研究USP46的活性; 采用定点突变法构建错义突变V89I, 用上述方法检测突变对酶活性的影响。结果发现, 人类*usp46*基因具有1 101 bp的开放阅读框, 编码366个氨基酸; 序列比对显示, 其在各个物种中高度保守; 在小鼠脾脏中mRNA表达量较高, 而骨骼肌中表达较少; 人类的USP46蛋白具有去泛素化酶活性, V89I突变后, 其活性显著下降, 仅为野生型的37.67%±2.52% ($P<0.05$)。结果表明, *usp46*基因在小鼠各组织中的mRNA表达水平存在差异; 人类USP46蛋白具有去泛素化酶活性, 而且其编码区V89I错义突变后, 其活性显著下降, 为抑郁症等神经精神性疾病的病因学研究提供了新的线索。

关键词 基因克隆; *usp46*; 基因表达水平; 酶活性; 基因突变

Molecular Cloning of Ubiquitin Specific Protease 46 and the Effect of Gene Mutation on Its Function

Zhang Jingkun¹, Zhang Wei^{2*}, Wei Qun³, Qi Sufen⁴, Mi Yingjun⁴, Jia Yuan⁵, Lü Hongzhi⁶, Zhao Jing⁷, Liu Shuxia²
(¹International Education College, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; ²Department of Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; ³Department of Nosocomial Infection Control, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050000, China; ⁴Department of Epidemiology and Statistics, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; ⁵Department of Nosocomial Infection Control, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; ⁶Orthopedic Research Institution of Hebei Province, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China; ⁷Department of Pharmacology, College of Chinese Integrative Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract This work was to investigate biological function and the effect of the missense mutation on the function of ubiquitin-specific protease 46 (*usp46*), which is associated with ‘behavioral despair’ in mice. The total RNA was extracted from human esophageal cancer cell line TE-1. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was applied to clone human *usp46* gene. The relative expression levels of *usp46* mRNA in

收稿日期: 2017-12-22

接受日期: 2018-03-13

河北省自然科学基金(批准号: H2015206449)和河北省卫生厅重点科技研究计划(批准号: ZD20140034)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0311-86265734, E-mail: ZWBL201309@126.com

Received: December 22, 2017

Accepted: March 13, 2018

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (Grant No.H2015206449) and the Department of Health of Hebei Province (Grant No.ZD20140034)

*Corresponding author. Tel: +86-311-86265734, E-mail: ZWBL201309@126.com

网络出版时间: 2018-05-25 10:44:34

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180525.1044.004.html>

mice were detected by quantitative Real-time PCR. The deubiquitinating enzyme activity assay was established to detect USP46 deubiquitinating enzymatic activity. Site-Directed Mutagenesis kit were used to generate *usp46* (V89I) and detect its effect on deubiquitinating enzyme activity. The results suggested that the human *usp46* gene had a 1 101 bp open reading frame, encoding 366 amino acids. The sequence alignment showed that *usp46* was highly conservative in many species. While weakly expressed in skeletal muscle, *usp46* mRNA strongly expressed in spleen of *Mus musculus*. The human USP46 protein had the deubiquitinating enzyme activity, and the activity of the V89I mutation was significantly decreased, which was only $37.67\% \pm 2.52\%$ of the wild type ($P < 0.05$). The results indicated that the expression levels of *usp46* mRNA in different organs of *Mus musculus* were significantly different. Moreover, the activity of V89I missense mutation decreased significantly, which provided a new clue of the etiology of neuropsychiatric disorders such as depression.

Keywords gene cloning; *usp46*; gene expression level; enzyme activity; genetic mutations

泛素-蛋白酶体途径(ubiquitin proteasome pathway, UPP)能够高选择性地降解细胞在应激和非应激条件下产生的蛋白质^[1], 参与调控细胞周期^[2]、肿瘤生长^[3]、免疫反应及炎症^[4]等众多的细胞进程, 对维持细胞的正常生理功能具有重要意义。泛素-蛋白酶体途径是一种动态的可逆过程, 它由多重的泛素结合酶级联反应和去泛素化酶共同调控^[5]。

人类基因组共编码100多种去泛素化酶(deubiquitinating enzymes, DUBs)^[6]。近年来发现, 多种去泛素化酶在神经精神性疾病^[7]的发生发展中发挥着重要的作用, 包括阿尔茨海默病^[8]、帕金森氏病^[9]和精神分裂症^[10]等。

泛素特异性蛋白酶46(ubiquitin-specific protease 46, *usp46*)属于去泛素化酶的泛素特异性蛋白酶(ubiquitin-specific protease)亚家族, 位于4号染色体长臂双向性情感障碍基因座上(4q12), 编码366个氨基酸^[11]。有研究表明, *usp46*基因为小鼠“行为绝望”的责任基因^[12-13]。最近研究发现, USP46通过去泛素化AMPA(谷氨酸受体)调控大脑的兴奋性突触传递, 与突触可塑性和大脑的功能密切相关^[14]。因此, 进一步提示, USP46很可能参与神经系统疾病的发生发展。然而*usp46*基因的生理功能目前仍不明确, 本研究旨在克隆人类*usp46*基因, 并探讨编码区错义突变对去泛素化酶功能的影响, 为阐明USP46在神经系统中的生理作用及其在抑郁症等神经精神性疾病中的作用提供新的研究思路和线索。

1 材料与方法

1.1 材料

C57BL/6J成年雄性小鼠购自河北医科大学动

物实验中心; 人类TE-1食管癌细胞株和大肠埃希菌DH5 α 分别为本实验室(河北医科大学病理教研室)保存; pGEM-T Easy载体购自Promega公司; pGEX-6p-1载体购自Sigma公司; pAC-T7质粒为本室保存质粒; 质粒小提试剂盒、SYBR Green Real-Time一步法试剂盒、TRNzol总RNA提取试剂、QuantScript RT Kit、Taq Platinum DNA Polymerase均购自天根生化科技有限公司; *Bam*H I、*Sal* I等内切酶购自New England Biolabs公司; GST-Sefinose(TM) Resin (Settled Resin)购自上海生工生物工程技术有限公司; QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit购自Stratagene公司; T7抗体购自Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取及cDNA合成 人类TE-1食管癌细胞株及小鼠各组织中总RNA采用TRNzol总RNA提取试剂分别进行提取, 采用1%琼脂糖电泳检测RNA完整性。分光光度计检测 D_{260} 和 D_{280} 处的吸光度值, 分析RNA纯度。之后用QuantScript RT Kit反转录试剂盒将总RNA反转录成cDNA, -20°C 储存备用。

1.2.2 人类*usp46*基因的分离 以人类TE-1细胞cDNA为模板, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。人类*usp46*的上游引物为: 5'-GGA TCC ATG ACT GTC CGA AAC ATC GC-3', 下游引物为: 5'-GTC GAC CGC AGG TCT TTC AGT TAC TC-3'。PCR扩增获得基因完整的开放阅读框, 纯化回收后连接至pGEM-T Easy Vector载体上, 由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。pGEX-*usp46*质粒构建: 将测序验证后的pGEM-T-*usp46*质粒用*Bam*H I/*Sal* I双酶切获得*usp46*基因目的片段。将GST表达载体pGEX-6p-1用*Bam*H I/*Sal* I双酶切, 二者1%琼脂糖凝

胶电泳切胶回收, 加入T4 DNA连接酶4 °C过夜连接, 转化提质粒, *Bam*H I/*Sal* I酶切鉴定。

1.2.3 *usp46*基因的生物学信息分析 运用Cluster W(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)在线序列比对软件对USP46蛋白进行多序列对比, 其他物种的USP46蛋白氨基酸序列均来自NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库。

1.2.4 qRT-PCR 小鼠*usp46*基因上游引物序列为: 5'-ATG ACT GTC CGA AAC ATC GC-3', 下游引物序列为: 5'-CGC ACT CCA CCA AGT TAT TC-3', 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。qRT-PCR采用SYBR Green Real-Time一步法试剂盒, 按照操作手册在Mx 3005P荧光定量PCR仪(Stratagene公司, 美国)上进行, 并进行熔解曲线分析及琼脂糖凝胶电泳检测产物。相对表达量按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算^[15]。

1.2.5 GST-USP46融合蛋白的表达及可溶性分析 挑选含有pGEX-*usp46*质粒单克隆菌株, 接种到LB液体培养基中(含有氨苄青霉素)。菌液扩增12 h后稀释10倍, 继续放置于摇床摇2 h, 加入1 mmol/L的异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG) 200 μ L诱导4~5 h。收集细菌, 4 °C、15 000 $\times$ g离心2 min, 弃上清, 加入100 μ L PBS, 吹打悬浮细菌, 超声悬液至澄清, 置于冰上。取出25 μ L全菌液(total, Tot), 加入20% Triton X-100, 冰浴30 min。15 000 $\times$ g离心5 min, 取25 μ L细菌上清(supernatant, Sup), 加入75 μ L PBS至细菌沉淀中, 吹打悬浮, 取出25 μ L细菌沉淀(pellet, Pel)。分别向Total、Sup、Pel中加入等量2 $\times$ SDS蛋白上样缓冲液, 混匀, 沸水浴2 min后进行10% SDS-PAGE电泳, 检测融合蛋白可溶性。以载体pGEX-6p-1质粒作为表达GST蛋白的对照组, 以同样方法诱导表达, 超声破碎提取蛋白。

1.2.6 去泛素化酶活性检测 pAC-T7-*usp46*(WT)质粒构建: 将测序验证后的pGEM-T-*usp46*质粒用*Bam*H I/*Sal* I双酶切, 将pAC-T7质粒用*Bam*H I酶切, 二者分别平末端化后凝胶回收, 加入T4 DNA连接酶4 °C过夜连接, 然后转化提质粒, 酶切鉴定。突变质粒构建: 由已构建的pAC-T7-*usp46*(WT)采用定点突变试剂盒QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit分别将第44号半胱氨酸定向突变为丝氨酸(C44S), 构建突变质粒pAC-T7-*usp46*(C44S); 将第89号缬氨酸突变为异亮氨酸(V89I), 构建突变质粒pAC-T7-*usp46*(V89I), 然后分别进行测序鉴定。

采用含T7启动子的USP表达质粒(pAC-T7-*usp46*)与pGEX-ub52模型底物质粒共表达, 经IPTG诱导表达后, 研究去泛素化酶将模型底物GST-ub52融合蛋白去泛素化的能力。本次研究中将表达载体pAC-T7-*usp46*、pAC-T7-*usp46*(C44S)或pAC-T7-*usp46*(V89I)与底物GST-ub52的表达质粒pGEX-ub52共转化表达细菌BL21。同时分别采用pAC-T7质粒作为阴性对照, 酵母菌中去泛素化酶UBP2的表达质粒pAC-UBP2作为阳性对照。表达蛋白后, 将细菌收集离心, 用GST-Sefinose™ Resin纯化蛋白系统(上海生工生物工程技术服务有限公司)纯化GST融合蛋白, 进行10% SDS-PAGE电泳检测, 应用BandScan图像系统分析野生型及突变型活性差异。采用T7抗体(一抗稀释浓度1:1 000)进行Western blot检测细菌裂解液中USP46蛋白表达水平。

1.3 统计学分析

计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用SPSS 18.0软件进行统计分析, 两组之间比较采用student *t* 检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

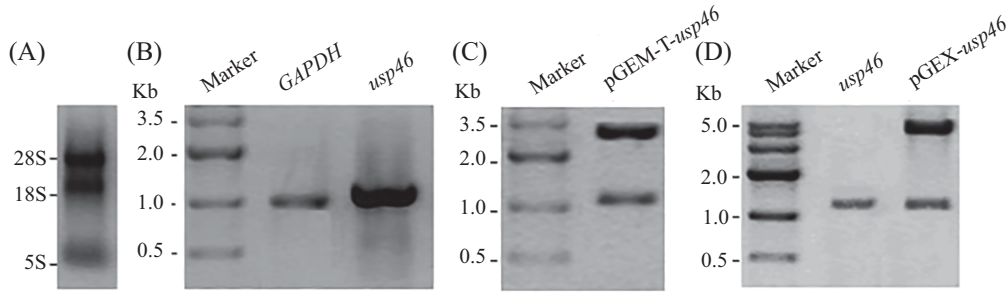
2 结果

2.1 人类*usp46*基因的克隆

提取人类TE-1食管癌细胞株中的mRNA, D_{260} 和 D_{280} 比值为 1.85 ± 0.20 , 浓度为1 100 μ g/ μ L。1%琼脂糖凝胶电泳可见28S、18S、5S 3条清晰条带, 表明所获得的总RNA无明显的降解, 纯度较高(图1A)。RT-PCR扩增出内参基因(*GAPDH*)和目的基因(*usp46*), 长度分别为1 000 bp和1 100 bp的特异条带, 与GenBank公布的序列大小相一致(图1B)。同样, 质粒pGEM-T-*usp46*酶切出的条带与目的条带大小一致, 分别为1 100 bp及3 000 bp, 测序结果证实扩增片段1 101 bp为人类*usp46*基因的编码区, 其序列与报道相一致(图1C)。 *Bam*H I/*Sal* I双酶切pGEX-*usp46*重组质粒, 酶切后出现4 900 bp及1 100 bp左右两条条带, 与质粒和目的片段大小一致(图1D)。

2.2 USP46蛋白序列多序列比对分析

对比分析*usp46*基因在人类(*Homo sapiens*)、牛(*Bos taurus*)、狗(*Canis lupus familiaris*)、斑马鱼[*Danio rerio (zebrafish)*]、鸡(*Gallus gallus*)、恒河猴(*Macaca mulatta*)、小鼠(*Mus musculus*)、黑猩猩(*Pan troglodytes*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)、热带爪



A: TE-1细胞总RNA; B: PCR扩增产物; C、D: *Bam*H I和*Sal* I双酶切鉴定质粒pGEM-T-*usp46*及pGEX-*usp46*。

A: total RNA isolated from TE-1 cell line; B: PCR products; C,D: the plasmid of pGEM-T-*usp46* or pGEX-*usp46* digested with *Bam*H I and *Sal* I.

图1 *usp46*基因的扩增及鉴定

Fig.1 Identification of *usp46* gene



保守结构域由图中方框表示, 其中关键氨基酸由星号标出。

Conserved domains are indicated by box, and the key amino acids are marked with an asterisk.

图2 人类、斑马鱼、黑猩猩等多种属氨基酸序列的多重对比分析

Fig.2 Multi-alignment of amino acid sequences of *Homo sapiens*, *Danio rerio* and *Pan troglodytes* etc

蟾(*Xenopus tropicalis*)中编码的氨基酸的异同。序列比对分析可见, 保守区域Cys-box、Asp-box和His-box中的特征性部位在不同种属中均一致, 符合泛素特异性蛋白酶的特征, 保守结构域由图中方框表示, 结构域中的特征部位由星号标出(图2)。

2.3 *usp46*在小鼠各组织中mRNA的表达水平

为研究*usp46* mRNA在小鼠各组织中的表达情况, 提取各组织中的RNA, 检测到*usp46*在骨骼肌、脑组织、心脏、脾脏、肾脏、肝脏、肺脏中mRNA的相对表达水平均有所不同。溶解曲线分析显示, *GAPDH*与*usp46*熔链温度不同, 出现两个高峰(图3A)。qRT-PCR结果显示, 各组织中均可检测出不同程度的*usp46* mRNA表达, 其中肺脏和脾脏中的表达量明显高于脑组织中的表达量, 分别是脑组织中表达量的2.74±0.13和2.95±0.06倍; 睾丸和肾脏中表达水平与脑组织相近; 而肝脏、心脏和骨骼肌中表达较少, 仅为脑组织中的0.60±0.01、0.19±0.02和0.06±0.00倍, 各组织之间表达差异均具有统计学意义($P<0.05$)(图3B)。

2.4 GST-USP46融合蛋白的表达及可溶性分析

重组质粒pGEX-*usp46*转化细菌经IPTG诱导, 出

现一分子量约70 kDa的蛋白表达(图4), 与GST(26 kDa)同USP46(44 kDa)相加的理论分子量值(70 kDa)相符(图4, 泳道2), 而未添加IPTG诱导的细菌未表达该蛋白(图4, 泳道1)。同时, 将pGEX-6p-1质粒转化细菌, 作为阴性对照, IPTG诱导后, 分子量为26 kDa左右有蛋白表达(图4, 泳道6), 与GST的分子量相一致, 未添加IPTG诱导的大肠杆菌不表达该蛋白(图4, 泳道5)。

融合蛋白GST-USP46与GST溶解性不同, GST为可溶性蛋白, 存在于上清中(图4, 泳道7); 而GST-USP46为不溶性蛋白, 以包涵体形式表达, 只存在于沉淀中(图4, 泳道4)。

2.5 去泛素化酶活性分析及基因突变对活性的影响

将*usp46*插入pAC-T7质粒构建表达载体pAC-T7-*usp46*(WT), 采用*Eco*R I内切酶进行酶切鉴定正反, 出现1.0 Kb和4.6 Kb左右条带的为反向插入, 出现1.9 Kb和3.7 Kb左右条带的为正向插入(图5A)。鉴定后证实*usp46*重组入载体, 测序结果证实, 序列在预期位点发生定点突变(图5B和图5C)。

采用去泛素化酶活性检测体系来检测人类USP46蛋白是否具有去泛素化酶活性。该方法采用GST-ub52作为模型底物, 阳性对照UBP2可将泛素与

底物连接处切断, 发挥去泛素化的功能, 产生大小约为36 kDa的蛋白(图6A, 泳道3)。人类USP46表达后, 与UBP2相同也将GST-ub52切断, 但活性比UBP2低(图6A, 泳道4), 仅为UBP2活性的66.67%±3.51%(图6B, $P<0.05$)。

当其保守区域Cys-box结构域中的关键氨基酸——半胱氨酸(C)突变为丝氨酸S(C44S)后, 同阴性对照相同(图6A, 泳道2), 没有切断GST-ub52, 失去了酶活性(图6A, 泳道5), 提示第44号氨基酸(半胱氨酸)为USP46酶活性的关键氨基酸位点。综上, 人类USP46蛋白具有去泛素化酶活性。

NCBI数据库中显示, 人类*usp46*基因存在7 609个单核苷酸多态性(SNP), 位于编码区的错义突变有61个。选取编码区第89位缬氨酸突变为异亮氨酸(V89I, rs191363028), 检测其酶活性的变化, 发现

其活性显著低于野生型(图6C), 仅为野生型活性的37.67%±2.52%, 下降了近62.33%, 差异有统计学意义(图6D, $P<0.05$)。T7抗体Western blot结果显示, 野生型和突变后细菌裂解液中USP46蛋白表达水平无明显差异($P>0.05$)。

3 讨论

去泛素化酶在维持游离泛素和泛素结合蛋白的动态平衡中发挥着重要作用。泛素特异性蛋白酶是去泛素化酶中成员最多、结构最具多样性的一类^[16]。近来研究发现, USP46作为泛素特异性蛋白酶家族的一员, 是小鼠“行为绝望”表型的责任基因^[12]。*usp46*基因第92号赖氨酸缺失会引起小鼠在悬尾试验和强迫游泳试验中不动时间显著缩短, 说明该基因与小鼠的行为绝望密切相关。

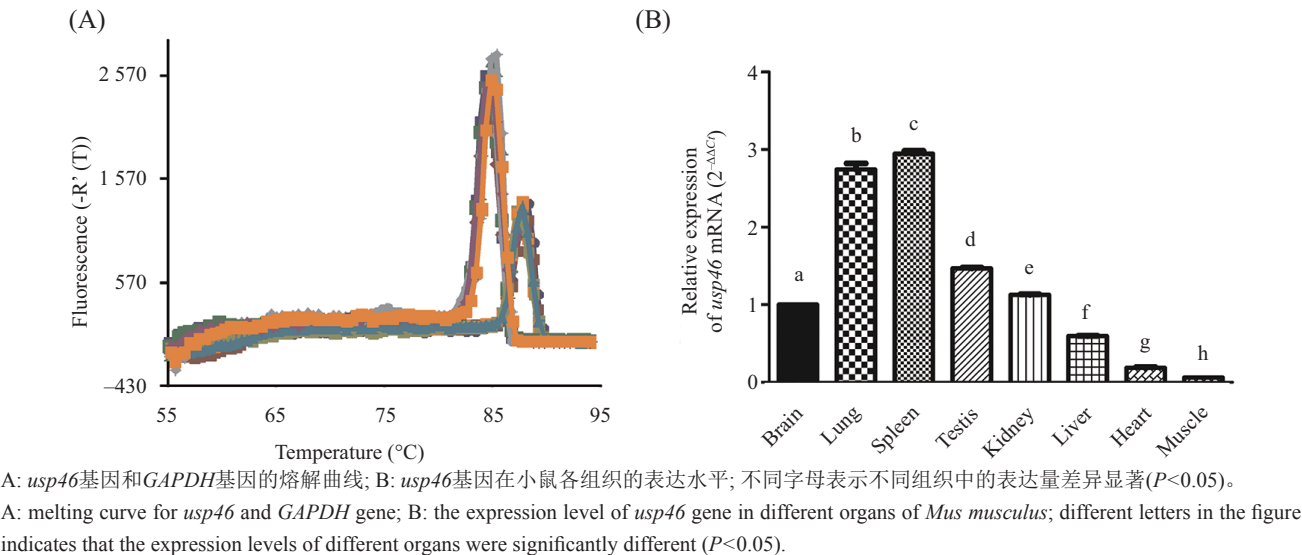


图3 *usp46*基因在小鼠各组织的表达水平

Fig.3 The expression level of *usp46* gene in different organs of *Mus musculus*

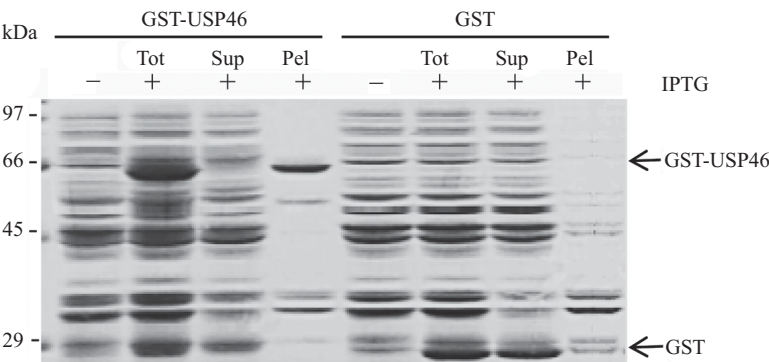
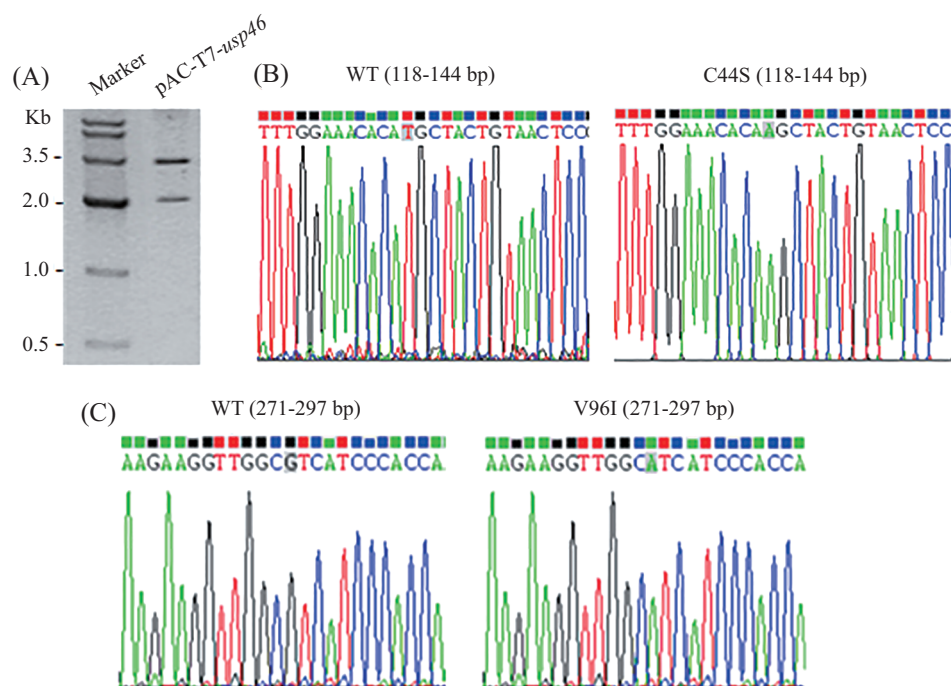


图4 GST-USP46融合蛋白的表达及可溶性分析

Fig.4 The expression and solubility analysis of GST-USP46 fusion protein

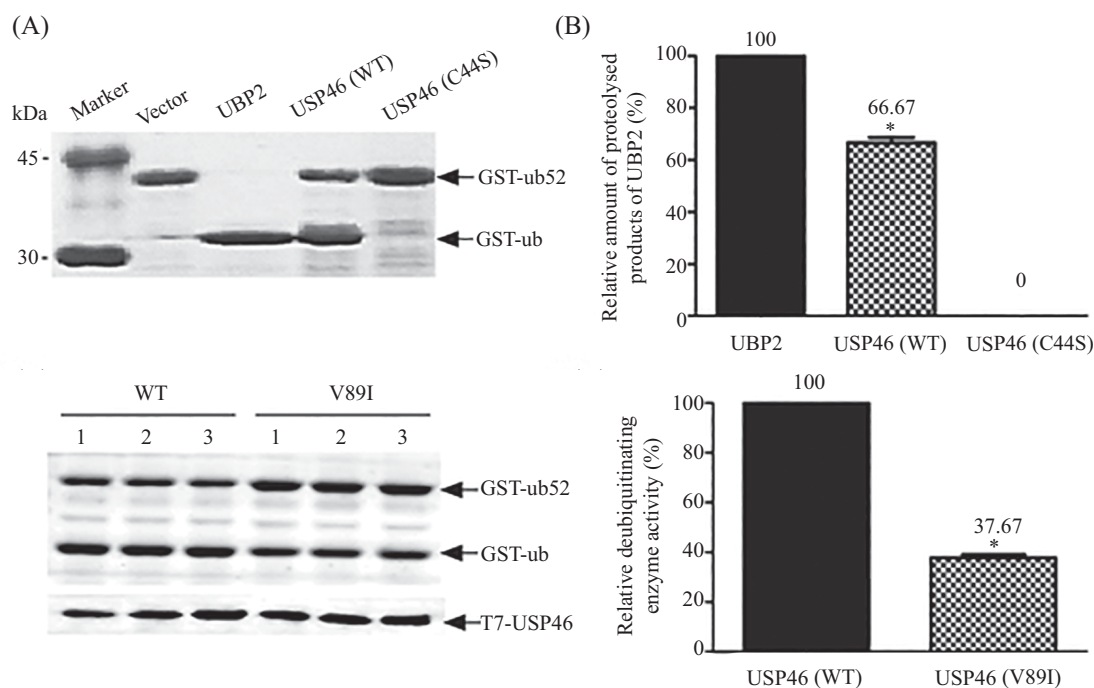


A: *EcoRI* 内切酶进行酶切鉴定 pAC-T7-*usp46*; B、C: pAC-T7-*usp46* 野生型和突变型测序结果。

A: the plasmid of pAC-T7-*usp46* digested with *EcoRI*; B,C: sequences results of the vectors of pAC-T7-*usp46* wild type and mutations.

图5 pAC-T7-*usp46* 质粒鉴定

Fig.5 Identification of pAC-T7-*usp46* vectors



A、B: USP46 去泛素化酶活性, 与底物表达质粒共转化的质粒分别是 pAC-T7 (阴性对照)、pAC-UBP2 (阳性对照)、pAC-T7-*usp46* (WT) 和 pAC-T7-*usp46* (C44S), * $P < 0.05$, 与阳性对照相比; C、D: USP46 (V89I) 突变后酶活性显著下降, * $P < 0.05$, 与野生型相比。

A,B: USP46 has deubiquitinating enzyme activity. The co-expressed plasmids are pAC-T7 (negative control), pAC-UBP2 (positive control), pAC-T7-*usp46* (WT) and pAC-T7-*usp46* (C44S), * $P < 0.05$ vs positive control; C,D: deubiquitinating enzyme activity of USP46 (V89I) declined significantly, * $P < 0.05$ vs wild type.

图6 USP46 去泛素化酶活性检测

Fig.6 Deubiquitinating enzyme activity of USP46

然而目前USP46的生物学功能仍不明确, 而该基因的克隆是研究其生物学功能的基础。本研究中我们克隆出人类 $usp46$ 基因。测序结果表明, 序列与GeneBank中的参考序列(NM_022832.3)一致, 基因编码区长1 101 bp, 编码366个氨基酸残基。USP家族成员都含有两个短而保守的片段, 即赖氨酸结构域和组氨酸结构域, 序列中具有起催化作用的三联残基^[16]。本次研究发现, $usp46$ 包含高度保守的结构域: Cys、Asp、His区域, 同泛素特异性蛋白酶的特征相符, 而且多物种序列比对分析表明, 多个物种氨基酸序列均相同, 这三个区域高度保守。

本研究采用qRT-PCR的方法研究了 $usp46$ 在小鼠各组织中的分布情况。本研究结果显示, 各组织中均可检测出不同程度 $usp46$ mRNA的表达。其中, 肺脏和脾脏中的表达量明显高于脑组织中的表达量, 分别是脑组织中表达量的 2.74 ± 0.13 和 2.95 ± 0.06 倍; 睾丸和肾脏中表达水平与脑组织相近; 而肝脏、心脏和骨骼肌中表达较少, 仅为脑组织中的 0.60 ± 0.01 、 0.19 ± 0.02 和 0.06 ± 0.00 倍。 $usp46$ 在小鼠各个组织中的普遍存在, 提示其具有重要的功能。

去泛素化酶主要是作用于泛素-蛋白酶体系统中已泛素化的蛋白底物, 通过裂解切断泛素链与底物蛋白之间的连接及泛素化链之间的连接, 使单泛素分子从泛素化蛋白底物上或从蛋白酶体降解底物中脱离出来, 重新进入细胞内蛋白调节的循环中^[1]。为探索USP46是否具有去泛素化酶活性, 我们建立了去泛素化酶活性分析体系, 原理是通过将模型底物GST-ub52和去泛素化酶的表达质粒共转化BL21细菌中, 研究去泛素化酶去除泛素的能力^[17]。模型底物GST-ub52是由人类Ub52融合蛋白的前体结合GST构成, 即泛素的序列由杂化蛋白的中间部分组成, GST-ub52大小约为42 kDa, 去泛素化酶将其切断后产生大小约为36 kDa的分裂产物, 运用GST蛋白精致系统可得到纯化的GST-ub52及分裂产物, 去除细菌中的其他蛋白, 利于结果的分析。去泛素化酶活性分析显示, 与UBP2相同, 人类USP46表达后产生了同样大小的分裂产物, 而突变后的USP46(C44S)没有切断模型底物GST-ub52, 提示第44号氨基酸(半胱氨酸)为USP46酶活性的关键氨基酸位点, 表明人类USP46具有去泛素化酶活性。

以往研究报道 $usp46$ 基因突变与小鼠“行为绝望”表型有关^[12]。受该实验结果的启发, 有研究者推

测人类 $usp46$ 基因多态性与GABA能系统相关的神经精神性疾病有关, 因此探索了 $usp46$ 的单核苷酸多态性与重性抑郁症^[18]、双相障碍和精神分裂症^[19]等精神疾病的关联性。其中, Fukuo等^[18]报道的 $usp46$ 基因标签SNP的单倍体与重性抑郁症相关, 提示 $usp46$ 基因在重性抑郁症的病理生理学中起一定的作用。

本课题组前期研究发现, $usp46$ 基因突变(第92号赖氨酸缺失), 造成其酶活性下降了72.96%^[20], 支持Tomida等^[12]报道的结论, 说明USP46突变引起的小鼠“行为绝望”表型的改变与其酶活性密切相关。人类 $usp46$ 基因是否存在类似突变引起USP46功能改变呢? 由此, 本研究检索了NCBI数据库, 显示人类 $usp46$ 基因存在7 609个单核苷酸多态性(SNP), 位于编码区的错义突变有61个。由于编码区基因突变往往影响蛋白的功能, 因此本研究选取编码区第89位缬氨酸突变为异亮氨酸(V89I, rs191363028), 检测其酶活性的变化, 结果发现, 其活性显著低于野生型, 下降了近62.33%, 差异有统计学意义。结构研究表明, 当结合泛素时, 去泛素化酶活性部位的结构会发生重排, 以促进分子间结合与催化水解^[21]。V89I临近Asp结构域, 而Asp结构域是稳定去泛素化酶活性所必需的^[22]。因此, V89I突变可能引起了活性部位结构的重排或活性位点氨基酸之间的距离, 从而影响酶活性的发挥, 具体机制仍有待进一步研究。

综上, $usp46$ 是小鼠“行为绝望”表型的责任基因, 小鼠中 $usp46$ 基因突变(第92号赖氨酸缺失, $\Delta 92$)导致酶活性的改变是突变小鼠在悬尾实验和强迫游泳实验中不动时间缩短的主要原因。本研究克隆了 $usp46$ 基因并检测了其功能, 发现人类 $usp46$ 基因第89位缬氨酸突变(rs191363028)引起USP46功能的变化, 提示人群中也可能存在类似于小鼠USP46 $\Delta 92$ 的错义突变, 这种错义突变可能会影响GABA能系统的功能, 与抑郁症等神经精神性疾病的发病相关。因此, 本研究不仅揭示了USP46的生理功能, 而且为进一步了解抑郁症等神经精神性疾病的病因和发病机制提供了新的研究方向和作用靶点。

参考文献 (References)

- 1 Tai HC, Schuman EM. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. Nat Rev Neurosci 2008; 9(11): 826-38.
- 2 Suresh B, Lee J, Kim KS, Ramakrishna S. The importance of

- ubiquitination and deubiquitination in cellular reprogramming. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 6705927.
- 3 Kim D, Hong A, Park HI, Shin WH, Yoo L, Jeon SJ, *et al.* Deubiquitinating enzyme USP22 positively regulates c-Myc stability and tumorigenic activity in mammalian and breast cancer cells. *J Cell Physiol* 2017; 232(12): 3664-76.
- 4 Liu B, Zhang M, Chu H, Zhang H, Wu H, Song G, *et al.* The ubiquitin E3 ligase TRIM31 promotes aggregation and activation of the signaling adaptor MAVS through Lys63-linked polyubiquitination. *Nat Immunol* 2017; 18(2): 214-24.
- 5 Popovic D, Vucic D, Dikic I. Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *Nat Med* 2014; 20(11): 1242-53.
- 6 Fraile JM, Quesada V, Rodriguez D, Freije JM, Lopez-Otin C. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene* 2012; 31(19): 2373-88.
- 7 Zheng Q, Huang T, Zhang L, Zhou Y, Luo H, Xu H, *et al.* Dysregulation of ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci* 2016; 8: 303.
- 8 Gong B, Radulovic M, Figueiredo-Pereira ME, Cardozo C. The ubiquitin-proteasome system: potential therapeutic targets for Alzheimer's disease and spinal cord injury. *Front Mol Neurosci* 2016; 9: 4.
- 9 Graham SH, Liu H. Life and death in the trash heap: The ubiquitin proteasome pathway and UCHL1 in brain aging, neurodegenerative disease and cerebral Ischemia. *Ageing Res Rev* 2017; 34: 30-38.
- 10 Andrews JL, Goodfellow FJ, Matosin N, Snelling MK, Newell KA, Huang XF, *et al.* Alterations of ubiquitin related proteins in the pathology and development of schizophrenia: Evidence from human and animal studies. *J Psychiatr Res* 2017; 90: 31-39.
- 11 Lambert D, Middle F, Hamshere ML, Segurado R, Raybould R, Corvin A, *et al.* Stage 2 of the Wellcome Trust UK-Irish bipolar affective disorder sibling-pair genome screen: evidence for linkage on chromosomes 6q16-q21, 4q12-q21, 9p21, 10p14-p12 and 18q22. *Mol Psychiatry* 2005; 10(9): 831-41.
- 12 Tomida S, Mamiya T, Sakamaki H, Miura M, Aosaki T, Masuda M, *et al.* Usp46 is a quantitative trait gene regulating mouse immobile behavior in the tail suspension and forced swimming tests. *Nat Genet* 2009; 41(6): 688-95.
- 13 Imai S, Mamiya T, Tsukada A, Sakai Y, Mouri A, Nabeshima T, *et al.* Ubiquitin-specific peptidase 46 (Usp46) regulates mouse immobile behavior in the tail suspension test through the GABAergic system. *PLoS One* 2012; 7(6): e39084.
- 14 Huo Y, Khatri N, Hou Q, Gilbert J, Wang G, Man HY. The deubiquitinating enzyme USP46 regulates AMPA receptor ubiquitination and trafficking. *J Neurochem* 2015; 134(6): 1067-80.
- 15 Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3(6): 1101-8.
- 16 Baek SH, Park KC, Lee JI, Kim KI, Yoo YJ, Tanaka K, *et al.* A novel family of ubiquitin-specific proteases in chick skeletal muscle with distinct N- and C-terminal extensions. *Biochem J* 1998; 334(Pt 3): 677-84.
- 17 Everett RD, Meredith M, Orr A, Cross A, Kathoria M, Parkinson J. A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. *EMBO J* 1997; 16(7): 1519-30.
- 18 Fukuo Y, Kishi T, Kushima I, Yoshimura R, Okochi T, Kitajima T, *et al.* Possible association between ubiquitin-specific peptidase 46 gene and major depressive disorders in the Japanese population. *J Affect Disord* 2011; 133(1/2): 150-7.
- 19 Kushima I, Aleksic B, Ito Y, Nakamura Y, Nakamura K, Mori N, *et al.* Association study of ubiquitin-specific peptidase 46 (USP46) with bipolar disorder and schizophrenia in a Japanese population. *J Hum Genet* 2010; 55(3): 133-6.
- 20 Zhang W, Tian QB, Li QK, Wang JM, Wang CN, Liu T, *et al.* Lysine 92 amino acid residue of USP46, a gene associated with 'behavioral despair' in mice, influences the deubiquitinating enzyme activity. *PLoS One* 2011; 6(10): e26297.
- 21 Kemp M. Recent advances in the discovery of deubiquitinating enzyme inhibitors. *Prog Med Chem* 2016; 55: 149-92.
- 22 Chou CK, Chang YT, Korinek M, Chen YT, Yang YT, Leu S, *et al.* The regulations of deubiquitinase USP15 and its pathophysiological mechanisms in diseases. *Int J Mol Sci* 2017; 18(3): E483.