

泛素融合降解蛋白UFD1的结构与功能

魏灵珠 程建徽 李琳 吴江*

(浙江省农业科学院园艺研究所, 杭州 310021)

摘要 泛素-蛋白酶体途径是细胞内蛋白质选择性降解的主要途径, 参与多种真核生物细胞生理过程, 与细胞的生理功能和病理状态有着密切的关系。该途径中UFD1作为泛素识别因子介导泛素化的靶蛋白至26S蛋白酶体降解。该文在概述泛素-蛋白酶体途径作用机制的基础上, 对哺乳动物和酵母UFD1蛋白的结构及其在细胞周期调控、转录调控、内质网相关蛋白降解中的功能进行了综述。

关键词 泛素; 蛋白酶体; UFD1; 结构; 功能

UFD1 (ubiquitin fusion degradation protein 1)是一种泛素识别因子^[1-2]。在哺乳动物和酵母中, 该蛋白通常与核定位蛋白Npl4 (nuclear protein localization 4)和II型AAA-ATPase (ATPase associated with diverse cellular activities)家族成员(p97/Cdc48)形成Cdc48/p97-UFD1-Npl4复合体来识别泛素化的底物蛋白至26S蛋白酶体降解^[3-5]。本文主要介绍UFD1蛋白参与的泛素-蛋白酶体途径及该蛋白的结构与功能。

1 泛素-蛋白酶体途径的作用机制

泛素-蛋白酶体途径是真核生物蛋白选择性降解的重要途径, 主要分为两个步骤: (1) 底物蛋白泛素化; (2) 泛素化的底物蛋白被26S蛋白酶体降解, 释放并重新利用泛素。由泛素(ubiquitin, Ub)、泛素激活酶(ubiquitin activating enzyme, E1)、泛素偶联酶(ubiquitin conjugating enzyme, E2)、泛素连接酶(ubiquitin protein ligase, E3)、泛素识别因子、26S蛋白酶体、泛素解离酶(deubiquitinating enzyme, DUB)等元件组成^[6-7]。

在泛素-蛋白酶体途径中, 泛素是一个可重复利用的底物蛋白识别信号, 通过三步酶结合级联反应(E1-E2-E3)与底物蛋白共价结合, 这一过程被称为底物蛋白泛素化(图1)。即在ATP存在的条件下, 泛素羧基端的甘氨酸与E1的半胱氨酸连接形成高能硫酯键而获得活性; E1-泛素中间体随即通过转酯作用将泛素转移到E2上形成E2-泛素中间体; E3与底物蛋白结合, 促使泛素从与E2形成的硫酯中间产物转移到底物蛋白赖氨酸残基的 ϵ 氨基上, 形成异肽

键^[8]。该过程属于蛋白翻译后修饰, 使得底物蛋白降解并释放游离的泛素^[9]。根据与底物蛋白结合的泛素数量, 泛素化分为单泛素化、多个单泛素化和多聚泛素化。单泛素化即单个泛素与底物蛋白的共价结合, 而多聚泛素化由多个泛素通过C末端的甘氨酸与相邻泛素的赖氨酸连接形成的聚合泛素链与底物蛋白共价结合而成^[10]。

26S蛋白酶体是ATP依赖型蛋白水解复合体, 由一个圆柱形的20S核心蛋白酶体和两个V形的19S调节颗粒组成^[11-12]。19S调节颗粒具有ATP依赖性和底物特异性, 负责解开折叠的底物蛋白, 裂解底物蛋白与泛素连接的共价键, 并引导解折叠的底物蛋白至20S蛋白酶体降解。聚合泛素链在泛素解离酶的作用下分解成单个泛素分子得以重新利用^[13]。20S核心蛋白酶体是一种不依赖于ATP和泛素的复合体, 由两个七聚体的 α 环和 β 环叠加形成空心圆柱体。中间的两个 β 环是活性位点, 含有胰蛋白酶、糜蛋白酶等水解活性, 具有断裂大多数肽键的能力。外部的两个 α 环分别与相邻的 β 环形成狭窄的通道, 控制解折叠的底物蛋白进入及降解后的氨基酸和短肽输出^[14-15]。

泛素化的底物在到达26S蛋白酶体以前还需要泛素融合降解蛋白1 (UFD1)等泛素识别因子的介导^[16-17]。Johnson等^[1]在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中首次分离到UFD1基因。随后, 在人类^[18]、

收稿日期: 2011-04-13 接受日期: 2011-07-07

现代农业产业技术体系建设专项(No.nycytx-30)和浙江省农业科学院创新能力提升工程(No.2010CX68)资助项目

*通讯作者。Tel: 0571-86405569, E-mail: nkywj@126.com

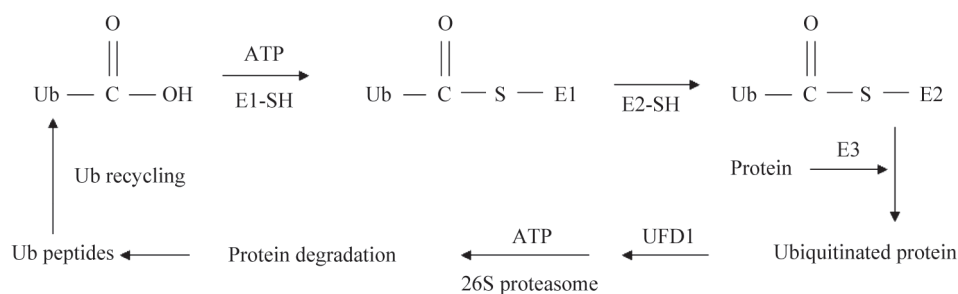


图1 泛素-蛋白酶体途径

Fig.1 The ubiquitin-26S proteasome pathway

小鼠^[19]、果蝇^[20]等动物中也相继发现了在泛素-蛋白酶体途径中发挥重要枢纽功能的编码UFD1蛋白同源基因。

2 UFD1蛋白的结构

哺乳动物UFD1蛋白功能分析结果表明其N端含有泛素结合位点, 而C端分别含有Npl4蛋白和p97蛋白结合位点, 是联系二者的纽带^[21-22]。通过与Npl4蛋白的结合来激活Npl4蛋白的UBD (ubiquitin fold domain)结构域与p97蛋白发生相互作用, 形成p97-UFD1-Npl4三元复合物(图2A)^[23]。Cdc48/p97蛋白是由两个AAA结构域(D1和D2)折叠而成的六聚体结构, 每个Cdc48/p97蛋白理论上可以结合6个UFD1-Npl4复合物^[24-25]。Pye等^[26]研究发现每个p97蛋白实际上只能结合1个UFD1-Npl4复合物, 这是由于p47等蛋白与UFD1-Npl4复合物同时竞争结合p97蛋白的结果。

Park等^[25]通过NMR分析发现UFD1蛋白与Cdc48/p97蛋白N端结构类似, 都包含两个结构上相对分离的基序: 即靠近N端的Nn基序和靠近C端的Nc基序。并且, 两种蛋白的Nn基序均由double-psi β barrel结构组成, Nc基序均由 α/β roll结构组成(图2B)^[24-25]。同时, UFD1蛋白和p97蛋白在Nn基序内还分别存在聚合泛素和单体泛素结合位点, 使得Cdc48/p97-UFD1-Npl4蛋白复合物能够更加稳定地固着泛素分子^[25-26]。Meyer等^[27]通过结构相似性分析推测哺乳动物Npl4蛋白C端的NZF (Npl4 zinc finger)结构域也能够结合泛素分子。

3 UFD1蛋白的功能

3.1 细胞周期调控

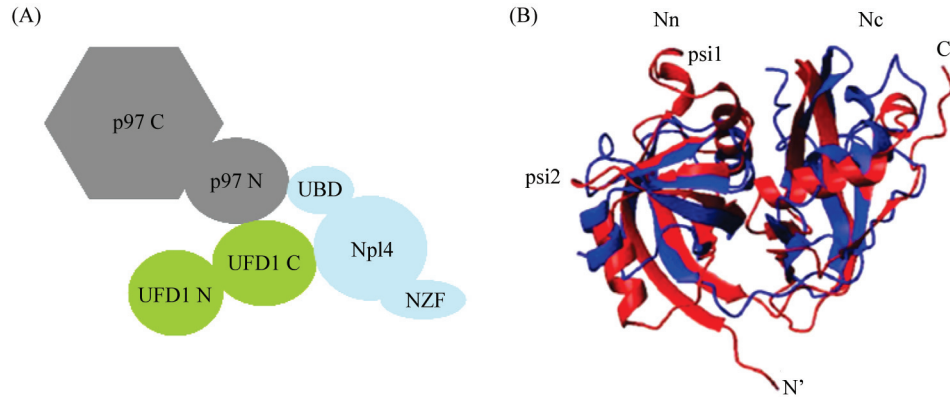
细胞周期是高度有组织的时序调控过程, 受到

多种蛋白元件的严格调控。在有丝分裂间期, p97-UFD1-Npl4蛋白复合物通过调节S期DNA复制检控点来确保DNA复制的高度精确性, 并对DNA复制受阻等细胞损伤及时做出反应, 以防止突变和遗传不稳定的发生^[28]。在有丝分裂中期, IAP (inhibitor of apoptosis protein)家族成员survivin通过与着丝粒的结合来调控染色体的排列与分离。而survivin蛋白与着丝粒的有效结合是通过p97-UFD1-Npl4蛋白复合物介导的泛素化过程来精细调控的^[29]。在有丝分裂后期, p97-UFD1-Npl4蛋白复合物通过调节微管聚合-解聚来调控纺锤体解聚^[30]。在有丝分裂末期, 该复合物还参与核膜形成的早期调控^[31]。

免疫荧光定位结果表明, p97蛋白、UFD1蛋白和Npl4蛋白均主要集中于细胞核^[27]。其中, Cdc48/p97蛋白的核定位序列位于N端, 与C端的Tyr磷酸化位点遥遥相对。其胞内定位具有细胞周期依赖性, 并受到C端Tyr磷酸化的调节。在静止期, 核定位序列结合在内质网膜上, 使其无法进行核转运。随着细胞有丝分裂的进行, C端Tyr的磷酸化导致Cdc48蛋白构象发生变化, 使得Cdc48蛋白从内质网膜上释放并暴露出N端的核定位序列, 进而转运入细胞核内。Western杂交结果表明, 哺乳动物p97蛋白C端的Tyr磷酸化仅限于有丝分裂过程中, 表明Tyr磷酸化对于Cdc48/p97蛋白的核定位及有丝分裂的调控作用^[32-33]。此外, Npl4蛋白作为核转运必需元件, 很可能在UFD1蛋白和Cdc48/p97蛋白的核转运过程中也发挥着关键作用^[27,34]。

3.2 转录因子激活

转录因子是真核生物在细胞核中启动基因正常转录的必需元件, 但并非所有的转录因子都合成于细胞核内并具有转录活性。比如NF- κ B (nuclear



A: p97-UFD1-Npl4蛋白复合体结构模型; B: UFD1蛋白和p97蛋白N端二级结构(根据参考文献[25]修改)。

A: the model for UFD1 interactions with Npl4 and p97; B: overlay of N domain of p97 and UFD1 (modified from reference [25]).

图2 UFD1蛋白结构模式图

Fig.2 The structural model of UFD1 protein

factor- κ B)家族转录因子Spt23即首先被合成为没有活性的前体蛋白p120, 利用IPT结构域相互作用形成p120-p120二聚体, 并通过C端的跨膜结构域锚定在内质网膜上。然后, 通过Cdc48-UFD1-Npl4蛋白复合体介导的泛素-蛋白酶体途径切除一个p120分

子C端的跨膜结构域, 保留其完整的N端转录因子结构域(p90), 形成仍锚定在膜上的p90-p120二聚体^[35]。随后, 泛素修饰的p90分子在Cdc48-UFD1-Npl4蛋白复合体作用下与p120分离, 进入细胞核内启动 Δ 9-不饱和脂肪酸基因OLE1的转录(图3)^[3,36-37]。

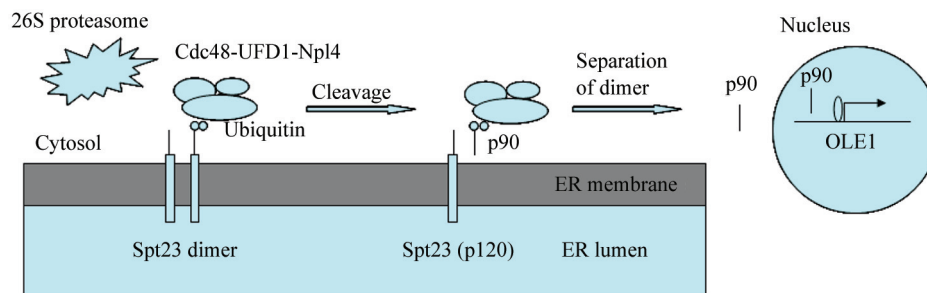


图3 Cdc48-UFD1-Npl4 蛋白复合体在激活Spt23转录活性过程中的作用(根据参考文献[3]修改)

Fig.3 Cdc48-UFD1-Npl4 complex acts at several stages of transcription factor Spt23 processing (modified from reference [3])

3.3 内质网相关蛋白降解

内质网是细胞质内延伸的膜体系, 与核膜相连, 负责分泌蛋白和脂类生物合成、新生肽折叠与组装、生物异源物质代谢等功能。对于发生错误折叠和组装的蛋白, 真核生物中存在精密的内质网相关蛋白降解系统(endoplasmic reticulum associated degradation, ERAD)来降解这些蛋白, 以确保其免受非正常蛋白的损害, 维持机体生理平衡和内环境稳定。在ERAD途径中, Cdc48/p97-UFD1-Npl4蛋白复合体负责识别内质网膜上泛素化的错误折叠蛋白, 并将其转运至26S蛋白酶体降解^[38-39]。

哺乳动物体内胆固醇生物合成限速酶HMG-

CoA (hydroxy methylgluaryl coenzyme A)还原酶的蛋白含量受到ERAD途径的调控^[37]。当体内胆固醇含量偏高时, HMG-CoA蛋白通过p97-UFD1-Npl4蛋白复合体介导的ERAD途径降解, 继而反馈调节体内胆固醇含量, 同时增加细胞对低密度脂蛋白的吸收^[40]。Cao等^[2]发现UFD1蛋白还能够与内质网膜锚定的泛素连接酶gp78直接结合, 依赖于UFD1蛋白的单体泛素结合位点增加gp78蛋白活性, 进而促进HMG-CoA还原酶蛋白的泛素化和降解。其gp78蛋白结合位置与Npl4蛋白结合位置恰好重叠, 二者同时竞争位于UFD1蛋白C端的结合位点。可见, UFD1蛋白在固醇诱导的HMG-CoA还原酶 ERAD途

径中具有双重功能: 一是通过单体泛素结合位点增加泛素连接酶gp78蛋白活性; 二是通过聚合泛素结合位点识别聚合泛素化的HMG-CoA还原酶蛋白参与降解^[2]。此外, 在发生错误折叠的CPY (carboxypeptidase Y)蛋白ERAD途径中, 酵母Cdc48-UFD1-Npl4蛋白复合体也发挥着识别泛素化的CPY蛋白并引导其参与降解的关键作用^[41]。

4 小结与展望

泛素参与的蛋白酶体降解途径在真核生物生理活动中发挥着重要的调控作用。生物体通过泛素-蛋白酶体途径进行废物处理, 降解连接泛素标签的废弃蛋白, 维持机体正常的生理活动。泛素-蛋白酶体途径发生故障, 各种病理状态必然接踵而至, 如182例表现心脏和面部畸形的DiGeorge综合征病人均在22q11.2区域发现UFD1基因缺失, 敲除UFD1基因的酿酒酵母表现为细胞死亡。作为联系蛋白泛素化过程与降解过程的泛素识别因子, UFD1蛋白在哺乳动物和酵母中主要以Cdc48/p97-UFD1-Npl4蛋白复合体形式存在, 功能保守且研究较为深入。近年来, UFD1蛋白因其介导的胞内调节功能在生物医学和新药开发领域受到特别瞩目, 如UFD1蛋白有望取代他汀类药物成为动脉硬化等疾病患者的治疗药物, 并可能作为治疗免疫系统失调等疾病的分子靶向。通过生物信息学分析发现哺乳动物和酵母基因组中仅含有一个UFD1基因, 与它们不同的是, 高等植物基因组中含有两个UFD1旁系同源基因^[42]。这种在哺乳动物和酵母中结构和功能保守的基因在同为真核植物的植物中以何种方式存在, 是否也发挥着如同哺乳动物和酵母中的神奇功效仍有待研究。

参考文献 (References)

- Johnson ES, Ma PC, Ota IM, Varshavsky A. A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem* 1995; 270(29): 17442-56.
- Cao J, Wang J, Qi W, Miao HH, Wang J, Ge L, *et al.* Ufd1 is a cofactor of gp78 and plays a key role in cholesterol metabolism by regulating the stability of HMG-CoA reductase. *Cell Metab* 2007; 6(2): 115-28.
- Bays NW, Hampton RY. Cdc48-Ufd1-Npl4: Stuck in the middle with Ub. *Curr Biol* 2002; 12(10): R366-71.
- Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA. Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: Dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J Cell Biol* 2003; 162(1): 71-84.
- Pye VE, Beuron F, Keetch CA, Robinson CV, Meyer HH, Zhang X, *et al.* Structural insights into the p97-Ufd1-Npl4 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(2): 467-72.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 425-79.
- Smalle J, Vierstra RD. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* 2004; 55: 555-90.
- Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 503-33.
- Downes B, Vierstra RD. Post-translational regulation in plants employing a diverse set of polypeptide tags. *Biochem Soc Trans* 2005; 33(Pt2): 393-9.
- Richard DV. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Mol Cell Biol* 2009; 10(6): 385-97.
- Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destructure for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002; 82(2): 373-428.
- Nickell S, Beck F, Scheres SH, Korinek A, Förster F, Lasker K, *et al.* Insights into the molecular architecture of the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(29): 11943-7.
- Glickman MH, Rubin DM, Larsen CN, Finley D. The regulatory particle of the yeast proteasome. *Mol Cell Biol* 1998; 18(6): 3149-62.
- Unno M, Mizushima T, Morimoto Y, Tomisugi Y, Tanaka K, Yasuoka N, *et al.* The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure* 2002; 10(5): 609-18.
- Cheng YF. Toward an atomic model of the 26S proteasome. *Curr Biol* 2009; 19(2): 203-8.
- Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destructure for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002; 82(2): 373-428.
- Park S, Isaacson R, Kim HT, Silver PA, Wagner G. Ufd1 exhibits the AAA-ATPase fold with two distinct ubiquitin interaction sites. *Structure* 2005; 13(7): 995-1005.
- Pizzuti A, Novelli G, Ratti A, Amati F, Mari A, Calabrese G, *et al.* UFD1L, a developmentally expressed ubiquitination gene, is deleted in CATCH22 syndrome. *Hum Mol Genet* 1997; 6(2): 259-65.
- Lindsay EA, Botta A, Jurecic V, Carattini-Rivera S, Cheah YC, Rosenblatt HM, *et al.* Congenital heart disease in mice deficient for the DiGeorge syndrome region. *Nature* 1999; 401(6751): 379-83.
- Ratti A, Amati F, Bozzali M, Conti E, Sangiuolo F, Berloco M, *et al.* Cloning and molecular characterization of three ubiquitin fusion degradation 1 (Ufd1) ortholog genes from *Xenopus laevis*, *Gallus gallus* and *Drosophila melanogaster*. *Cytogenet Cell Genet* 2001; 92(3/4): 279-82.
- Hetzer M, Meyer HH, Walther TC, Bilbao-Cortes D, Warren G, Mattaj JW. Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly. *Nat Cell Biol* 2001; 3(12): 1086-

- 91.
- 22 Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA. Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: Dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J Cell Biol* 2003; 162(1): 71-84.
- 23 Bruderer RM, Brasseur C, Meyer HH. The AAA ATPase p97/VCP interacts with its alternative co-factors, Ufd1-Npl4 and p47, through a common bipartite binding mechanism. *J Biol Chem* 2004; 279(48): 49609-16.
- 24 Zhang X, Shaw A, Bates PA, Newman RH, Gowen B, Orlova E, *et al.* Structure of the AAA-ATPase p97. *Mol Cell* 2000; 6(6): 1473-84.
- 25 Park S, Isaacson R, Kim HT, Silver PA, Wagner G. Ufd1 exhibits the AAA-ATPase fold with two distinct ubiquitin interaction sites. *Structure* 2005; 13(7): 995-1005.
- 26 Pye VE, Beuron F, Keetch CA, McKeown C, Robinson CV, Meyer HH, *et al.* Structural insights into the p97-Ufd1-Npl4 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(2): 467-72.
- 27 Meyer HH, Wang Y, Warren G. Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. *EMBO J* 2002; 21(21): 5645-52.
- 28 Mouysset J, Deichsel A, Moser S, Hoege C, Hyman AA, Gartner A, *et al.* Cell cycle progression requires the CDC-48^{UFD-1/NPL-4} complex for efficient DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(35): 12879-84.
- 29 Vong QP, Cao K, Li HY, Iglesias PA, Zheng Y. Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of surviving. *Science* 2005; 310(5753): 1499-504.
- 30 Cao K, Nakajima R, Meyer HH, Zheng Y. The AAA-ATPase Cdc48/p97 regulates spindle disassembly at the end of mitosis. *Cell* 2003; 115(3): 355-67.
- 31 Hetzer M, Meyer HH, Walther TC, Bilbao-Cortes D, Warren G, Mattaj JW. Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly. *Nat Cell Biol* 2001; 3(12): 1086-91.
- 32 Madeo F, Schlauer J, Zischka H, Mecke D. Tyrosine phosphorylation regulates cell cycle-dependent nuclear localization of Cdc48p. *Mol Biol Cell* 1998; 9(1): 131-41.
- 33 Meyer HH, Shorter JG, Seemann J, Pappin D, Warren G. A complex of mammalian Ufd1 and Npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *EMBO J* 2000; 19(10): 2181-92.
- 34 DeHoratius C, Silver PA. Nuclear transport defects and nuclear envelope alterations are associated with mutation of the *Saccharomyces cerevisiae* NPL4 gene. *Mol Bio Cell* 1996; 7(11): 1835-55.
- 35 Hoppe T, Matuschewski K, Rape M, Schlenker S, Ulrich HD, Jentsch S. Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* 2000; 102(5): 577-86.
- 36 Rape M, Hoppe T, Gorr I, Kalocay M, Richly H, Jentsch S. Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48 (UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone. *Cell* 2001; 107(5): 667-77.
- 37 Hitchcock AL, Krebber H, Fietze S, Lin A, Latterich M, Silver PA. The conserved Npl4 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation. *Mol Biol Cell* 2001; 12(10): 3226-41.
- 38 Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA. The AAA-ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from ER into the cytosol. *Nature* 2001; 414(6864): 652-6.
- 39 Richly H, Rape M, Braun S, Rumpf S, Hoege C, Jentsch S. A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell* 2005; 120(1): 73-84.
- 40 Song BL, Javitt NB, Bose-Boyd RA. Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell Metab* 2005; 1(3): 179-89.
- 41 Jarosch E, Taxis C, Volkwein C, Bordallo J, Finley D, Wolf DH, *et al.* Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol* 2002; 4(2): 134-9.
- 42 Wei LZ, Tao Y, Jia HY, Zhang LX, Xu P, Wang YZ, *et al.* Highly conserved UFD1 proteins among eukaryotes exhibit considerable C-terminus diversity in different taxa. *Plant Mol Biol Rep* 2009; 27: 439-47.

Structure and Functions of Ubiquitin Fusion Degradation Protein 1

Wei Lingzhu, Cheng Jianhui, Li Lin, Wu Jiang*

(Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract Ubiquitin-26S proteasome system (UPS) is the crucial regulatory signaling for selective protein degradation in a number of biologically important processes, such as development, cell cycle progression and stress tolerance. UFD1 mediates ubiquitination and degradation of tagged proteins by association with Npl4 and Cdc48/p97. Based on the simple summarization of UPS, we reviewed the structure and role of UFD1 in mitosis regulation, transcription factor activation, and endoplasmic reticulum associated degradation.

Key words ubiquitin; proteasome; UFD1; structure; function

Received: April 13, 2011 Accepted: July 7, 2011

This work was supported by the Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (No.nycytx-30) and Innovation Project of Zhejiang Academy of Agricultural Sciences (No.2010CX68)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86405569, E-mail: nkywj@126.com