

组蛋白的泛素化与去泛素化修饰

宋春雷 刘红林*

(南京农业大学动物科技学院, 南京 210095)

摘要 泛素在真核生物体内广泛存在, 泛素化修饰是转录后的修饰方式之一; 组蛋白是染色质的主要成分之一, 与基因的表达有密切关系。组蛋白的泛素化修饰与经典的蛋白质的泛素调节途径不同, 不会导致蛋白质的降解, 但是能够招募核小体到染色体、参与 X 染色体的失活、影响组蛋白的甲基化和基因的转录。组蛋白的去泛素化修饰同样与染色质的结构及基因表达密切相关。组蛋白的泛素化和磷酸化、乙酰化、甲基化修饰之间还存在协同和级联效应。

关键词 泛素; 组蛋白; 泛素化; 去泛素化

蛋白质在生命过程如细胞信息传递、物质代谢、机体防御等方面发挥着重要的作用, 人们对泛素-蛋白酶体途径介导的蛋白质的降解机制也已经基本清楚。但近年来发现有些蛋白质(例如组蛋白)在被泛素化修饰后并不能使蛋白质降解。本文仅就组蛋白的泛素化、去泛素化以及与乙酰化、甲基化磷酸化之间的关系作一简单介绍。

1 泛素及经典的泛素化调节途径

泛素(ubiquitin, Ub)是高度保守的、含 76 个氨基酸的蛋白质, 分子量为 8.5 kDa, 在真核生物体内广泛存在。泛素分子氨基端 1~72 位点的氨基酸残基形成一个紧密折叠的球状结构, 紧靠羧基端的 4 个氨基酸残基是随机盘绕的^[1]。

蛋白质的泛素化修饰就是蛋白质的赖氨酸残基位点与泛素分子的羧基末端相互结合的过程。由于泛素分子本身有 7 个赖氨酸残基位点, 并且泛素本身的赖氨酸残基也可以与泛素分子相互结合, 因此底物蛋白的一个赖氨酸残基可能结合多个泛素分子, 这样就形成了蛋白质的多泛素化修饰。蛋白质的多泛素化链中, 泛素羧基末端 76 位点的甘氨酸残基通常与前一个泛素分子的 48、63、29 或 11 位点的赖氨酸残基结合^[2~4]。48 位点的赖氨酸残基表面有连续的疏水片段, 这个片段是结合蛋白水解酶所必须的, 也是底物被泛素化修饰后降解所必须的。当泛素的赖氨酸残基连接 4 个或者超过 4 个泛素标签时, 则底物蛋白就可能通过 26S 蛋白酶作用而降解。蛋白质还可以被单泛素化修饰。单泛素化修饰就是底物蛋白的一个或几个赖氨酸残基仅结合一个泛素分子。单

泛素化可能影响底物局部的三维空间结构。蛋白质的单泛素化修饰是可逆转的、非蛋白质水解的调控, 可以调控如内吞作用、组蛋白的活性、DNA 修复等过程^[5,6]。真核细胞中泛素化修饰后的靶蛋白可能被降解、可能被转移到细胞内或细胞外的特定部位, 也有可能引起靶蛋白的功能发生变化, 这主要取决于靶蛋白所加的泛素链的结构, 以及泛素链的长短。

2 泛素化调节途径相关的酶

泛素化调节途径共有三类酶催化^[7]: 泛素激活酶(ubiquitin-activating enzyme, E1), 泛素接合酶(ubiquitin-conjugating enzyme, E2), 泛素-蛋白质连接酶(ubiquitin-protein ligase, E3)。首先, 由泛素激活酶催化, 泛素的羧基末端与泛素激活酶的半胱氨酸激活位点以硫酯键(thiol ester bond)结合, 此过程需要消耗 ATP。第二步, 泛素被转运到泛素接合酶的半胱氨酸残基, 也是以硫酯键的形式接合; 接合酶共有超过 20 个这样的半胱氨酸残基激活位点。最后, 在泛素连接酶的作用下, 通过泛素的羧基末端与底物蛋白的赖氨酸 ε-氨基基团之间形成肽键(isopeptide)而将泛素转移到底物蛋白上。E3 对靶蛋白的特异性识别在泛素调节途径中起决定作用。多聚泛素化需要以上三种酶的共同作用, 而单泛素化一般仅需要前两种酶。迄今为止, 发现并且鉴定的 E3 主要有两大类: HECT(homologous to the E6-AP carboxyl terminus)结构域家族和 RING(really interesting new gene)结构域家族。HECT 结构

收稿日期: 2006-05-08 接受日期: 2006-09-06

* 通讯作者。Tel: 025-84395106, E-mail: liuhonglin@263.net

域主要是通过泛素形成催化作用所必需的硫酯键发挥作用,而RING结构域为E2和底物提供居留位点从而使E2催化泛素转移到底物上。

像乙酰化和磷酸化一样,组蛋白泛素化是可逆转的调控。因此,组蛋白泛素化的动态平衡过程由两个因素决定:细胞内可以利用的游离泛素和可以对组蛋白添加或移除泛素的酶的活性。将泛素加到组蛋白需要一系列酶E1、E2、E3的作用。泛素部分的移除需要肽酶(isopeptidase)的活性。虽然所有蛋白质的泛素化修饰使用相同的E1和不同的E2,但是不同蛋白质的泛素化似乎需要特异性的E3。两个芽殖酵母蛋白Rad6、Cdc34,在体外已经显示在没有E3的存在下,能够泛素化组蛋白H2B^[8]。然而,体内研究发现仅Rad6是H2B泛素化所必须的^[9]。近来的研究显示Rad6相关的RING蛋白Brel可能是H2B泛素化的E3,因为RING结构域的Brel突变在体内取消了H2B的泛素化^[10]。研究还证明Rad6和Brel在进化中是保守的。相对于酵母的Rad6,HR6A和HR6B是在哺乳动物体内的两个同源物。实验表明HR6A和HR6B在体内能够部分的弥补酵母的Rad6突变,在体外能够泛素化组蛋白H2B^[11]。在人类也发现了Brel两个推定的同源盒^[12]。

与H2B泛素化的情形不同,生物体内并未发现H2A泛素化的E2、E3。体外研究发现纯化的Rad能够泛素化H2A、H2B。但是,还不清楚H2A和H2B在体内是否拥有相同的E2。酵母中检测不到H2A的泛素化,这阻碍了对E2、E3的研究。小鼠精子发生过程中uH2A的分析揭示了HR6B与uH2A有强烈的关联^[13]。然而,在HR6B剔除小鼠体内未检测到uH2A。这个结果尽管可以解释为HR6A和HR6B之间可能有功能上的重复,但是也说明HR6B在H2A泛素化过程中可能没有功能。考虑到在哺乳动物体内还有两个推定的Brel同源盒,HR6A和HR6B这两个蛋白质中是否有一个在体内有E3的功能可能需要进一步研究。

3 组蛋白的泛素化修饰

染色质是一系列核小体相互连接成的念珠状结构。核小体的核心是由组蛋白H2A、H2B、H3、H4各两个分子构成的八聚体,在八聚体的表面缠绕有1.75圈的双螺旋DNA。相邻的两个核小体之间由DNA连接,称为纤丝(fiber),在纤丝部位结合有组蛋白分子H1。在组蛋白H1存在时,核小体之间紧

密接触,形成直径为10 nm的纤维状结构。这就是染色体构型变化的一级结构。在染色质中,DNA和组蛋白是染色质的稳定成分,组蛋白与DNA的含量之比接近1:1。组蛋白是染色质的主要蛋白质成分,通过带正电荷的氨基末端区域与带负电荷的DNA骨架相互作用,对基因的表达有重要调控作用。目前研究发现,组蛋白除了可以被乙酰化、甲基化、磷酸化等修饰以外,还能被泛素化修饰。

组蛋白H2A在1975年被首次发现有泛素化修饰^[14],其泛素化修饰位点是高度保守的赖氨酸残基119(K119)位点。研究发现在大量高等真核生物中H2A总量的5%~15%被泛素化,除了在芽殖酵母^[15]中没有发现泛素化的组蛋白H2A(ubiquitinated-H2A, uH2A)以外,在许多组织和细胞中都发现有多聚泛素化(polyubiquitination)的H2A^[16]。研究还发现,组蛋白H2A的泛素化能够促进组蛋白H1与核小体的结合,促进多聚梳群蛋白(polycomb group protein)的沉默^[17],还在X染色体失活的起始过程中有重要作用^[18,19]。

除了H2A以外,组蛋白H2B也可以被泛素化修饰。尽管染色质中泛素化的组蛋白H2B量并不多,约占1%~2%,但是在从芽殖酵母到人类的真核生物中广泛分布。H2B的泛素化位点也定位于羧基端的赖氨酸残基:哺乳动物的赖氨酸120(K120)位点,芽殖酵母K123位点^[20]。对芽殖酵母*S. cerevisiae*的研究发现,组蛋白H3的4位赖氨酸的二甲基化或三甲基化需要H2B的123位赖氨酸的泛素化^[21],说明一个组蛋白亚单位的修饰能够调控另一个不同亚单位的修饰;研究还发现H3的4位赖氨酸的甲基化能够导致端粒附近基因的沉默,因此H2B的甲基化能够间接调控基因的沉默。Robzyk等^[15]研究发现,H2B的123位赖氨酸泛素化位点的突变能够影响有丝分裂细胞的生长和减数分裂。在对人类乳腺癌细胞的研究发现^[22]:组蛋白H2B在染色质中的水平与正在进行的转录有关,特别是依赖于核不均RNA(hnRNA)的合成。当核小体在转录过程中开放时,组蛋白H2B会被泛素化,并阻止核小体的重新折叠,以促进下一轮的转录。此外,研究还发现泛素化的组蛋白H2B优先富集于染色质的转录激活区域^[16],组蛋白H2B的泛素化还与聚合酶的延伸有关^[23],以上可以推测组蛋白H2B的泛素化能够促进基因的转录。

研究还发现H2B的123位赖氨酸的泛素化还能影响H3的79位赖氨酸的甲基化。Ng等^[24]报道H2B的123位赖氨酸和H3的79位赖氨酸在核小体内的空

间位置非常靠近, H2B的123位赖氨酸的泛素化对H3的79位赖氨酸的甲基化很重要, 但反过来H3的79位赖氨酸的甲基化对H2B的123位赖氨酸的泛素化却没有影响。

综上所述, 组蛋白H2B的泛素化修饰对基因的表达有调控作用。Henry^[25]等通过对 *GAL1* 基因表达的研究, 提出了一个组蛋白H2B泛素化调控基因转录的模型: *GAL1* 基因的正常转录需要组蛋白H2B的泛素化和去泛素化修饰, 并且泛素化过程非常短暂。首先组蛋白H2B发生泛素化修饰, H2B的泛素化修饰导致了H3的4位赖氨酸的甲基化; 紧接着H2B发生去泛素化, 这又诱使H3的36位赖氨酸甲基化, 此时 *GAL1* 基因能够正常转录。如果组蛋白H2B未发生泛素化, 则H3的4位赖氨酸不会甲基化, 此时H3的36位赖氨酸高甲基化, 从而基因低水平转录。但是如果组蛋白H2B虽然发生了泛素化修饰, 而随后没有去泛素化修饰, 则H3的4位赖氨酸高甲基化、H3的36位赖氨酸低甲基化, 此时基因仍然只能低水平转录。由此可见H2B去泛素化能够促进H3的4位赖氨酸和H3的36位赖氨酸之间的甲基化平衡, 从而调控 *GAL1* 基因的正常转录。

泛素化形式的H3不多, 仅在大鼠睾丸变态的精子细胞中有发现^[26]。在对果蝇体外实验的研究发现: 真核生物基因转录所必须的通用转录因子TFIID的成分TAFII250, 能够参与组蛋白H1泛素化激活、共轭接合^[27], 这也是首次报道同一个蛋白质内有E1、E2两种酶的活性。相比较而言, 组蛋白H3、H1的泛素化形式比H2A、H2B少, 目前也还没有发现组蛋白H3、H1的泛素化位点。

另外, 核心组蛋白的变异体也发现有泛素化修

饰。如巨大组蛋白H2A1.2 (macro H2A1.2)的K115、K116位点^[28,29]等都发现有泛素化修饰。泛素化的macro H2A可以招募组蛋白H1到核小体以使染色质进一步压缩, 并且在雌性哺乳动物的X染色体失活过程中, 组蛋白H2A和macro H2A的泛素化可能有协同作用^[28]。各种组蛋白的泛素化修饰见表1。

4 组蛋白的去泛素化修饰

泛素部分可以通过泛素76位点甘氨酸的肽键水解而移除。目前发现至少有90种去泛素化酶, 并且这些酶有序列多样性。由于细胞内泛素不是游离的单体, 而是以多聚泛素蛋白和泛素核糖体融合蛋白的形式存在, 因此去泛素化酶是从多聚泛素链、泛素前体物质和泛素缀合物中生成泛素单体的关键。去泛素化酶分为两个家族^[30]: 泛素羧基端水解酶家族(Ub C-terminal hydrolase, UCH)和泛素特异性加工蛋白酶家族(Ub-specific processing protease, UBP)。泛素羧基端水解酶家族分子量一般较小(除了BAP1, 81 kDa), 约20~30 kDa, 并且有组织特异性。UCH家族的核心催化域与已知的木瓜蛋白酶样半胱氨酸蛋白酶非常相似, 有230个氨基酸核心催化域, 能够水解泛素羧基端的酰胺基和酯键。

UBP的核心催化域有350个氨基酸。芽殖酵母有16种UBP, 分子量从50~250 kDa不等。这些UBP间的不同在于其不同的氨基端延伸物, 这些氨基端延伸物能够识别底物特异性。第一个被分离出的UBP是Ubp4。Ubp4的突变导致酵母MAT α 2因子的降解缺陷^[31], 并且Ubp4负责将多聚泛素肽链从底物上移除。另外, 研究显示Ubp3与Sir4(与异染色质沉默有关)有关, 但是目前还不清楚这个泛素蛋白酶的底

表1 已知的组蛋白泛素化修饰

组蛋白	已知的泛素化位点	组蛋白泛素化的作用	参考文献
H2A	K119	促进H1与核小体的结合, 促进polycomb的沉默, 参与X染色体的失活	[9] [17] [18, 19]
H2B	K120 (哺乳动物), K123 (酵母)	促进H3K4的甲基化, 有丝分裂、减数分裂, 与转录有关, 影响K79的甲基化, 与RNA聚合酶II的延伸有关	[21] [15] [16, 22] [24] [23]
H3	未知	精子变态	[26]
H1	未知	转录的激活	[27]
macro H2A1.2	K115, K116	招募核小体到染色体, 参与雌性X染色体的失活	[28, 29]

物。

有研究发现 Ubp8 的突变 (SAGA 复合物的成分) 会导致 uH2B 的增加^[25,32]。此外, 野生酵母纯化的 SAGA 复合物能够在体外去泛素化 H2B, 而源自 Ubp8 缺失酵母的 SAGA 复合物却没有这种功能。Ubp3 突变体未发现有这样的效果, 因而 Ubp8 对 uH2B 的影响可能是特异性的。在对芽殖酵母的研究发现, H2B 的泛素化是可逆转的过程, 泛素的移除是被 Ubp8 催化的。但是令人不解的是, 在 SAGA 复合物中有两种组蛋白修饰活性 (去泛素化和乙酰化)。研究发现, Ubp8 作为组蛋白 H2B 的去泛素化酶, 能够被招募到 GAL10 基因的上游激活序列, 是 GAL10 基因表达所必须的^[33]。由于 Ubp8 的同源物存在于从植物到人类的大量的生物体内, 因此 Ubp8 同源物是否参与 H2A 的去泛素化还有待研究。

研究证实组蛋白的去泛素化与染色质的凝集有关^[34]。组蛋白在有丝分裂间期是泛素化的, 但在有丝分裂中期组蛋白被去泛素化, 此时染色质凝集成染色体。到有丝分裂后期染色体解聚成染色质时, 组蛋白又被重新泛素化。在哺乳动物细胞中分离出一种去泛素化酶 UbpM^[35], 发现 UbpM 也参与染色质的凝集, 突变后能够阻滞细胞分裂。另外, 组蛋白去泛素化酶 Ubp10 还能够使组蛋白去泛素化而维持端粒的长度和稳定性^[36]。Mimnaugh 等^[37]也发现组蛋白 H2A 的去泛素化与核固缩和染色质凝集密切相关, 并且认为这些信号是细胞凋亡的前兆。

5 泛素化与磷酸化、乙酰化、甲基化的关系

泛素化和磷酸化有几个共同的特征^[38]: (1) 二者都是可逆的共价结合修饰。磷酸化能被蛋白磷酸酶逆转; 泛素化也能被蛋白酶或去泛素化酶逆转。(2) 反应迅速。两种修饰反应都能在几分钟或几秒钟内快速发生。(3) 泛素化和磷酸化都是高度特异性的, 并且被一系列不同的酶控制。人类基因组计划证明有超过 40 种不同的 E2、500 种不同的 E3、80 种不同的去泛素化酶。研究还显示人类有蛋白激酶 518 种、磷酸化酶 120 种。(4) 泛素化和磷酸化都能通过结合特异性氨基酸的结构域检测。

近年来的研究发现, 组蛋白的乙酰化能够破坏核小体核心颗粒的稳定性^[39]。另外, H2A、H2B 的泛素化能够减弱染色质中 H2A-H2B 二聚体与 H3-H4 四聚体之间的相互作用^[40]。在精子发生过程中, 如果

转录起始和延伸确实需要 H2A-H2B 二聚体被鱼精蛋白替换, 则这些组蛋白的泛素化可能与乙酰化一起, 通过降低 H2A-H2B 二聚体替换需要的能量促进转录。因此, 在转录过程中组蛋白乙酰化和泛素化可能有协同作用。

组蛋白泛素化与甲基化也存在某种联系。研究发现 Set1 介导的 H3K4 的甲基化需要 Rad6 催化 H3 的 123 位赖氨酸的泛素化^[21]。然而, SET1 基因的剔除并不会影响 H2B 的 123 位赖氨酸的泛素化, 这暗示二者之间有一个调控路径: H2B 的泛素化在 H3K4 甲基化的上游^[21]。以后的研究发现 H3K79 的甲基化也依赖于 Rad6 介导的 H2BK123 的泛素化^[24], 但是 H3K36 的甲基化似乎与 H2BK123 的泛素化无关^[24,41]。因此, 关于组蛋白泛素化与甲基化之间的关系可能还需要进一步的实验证明。

组蛋白是染色质的主要成分, 随着研究的深入, 组蛋白在外成遗传中的作用越来越受到人们的关注。组蛋白的泛素化修饰能够招募核小体到染色体、参与 X 染色体的失活、影响组蛋白的甲基化和基因的转录。组蛋白的泛素化和去泛素化是基于组蛋白修饰的基因表达调控的机制之一, 它和组蛋白的乙酰化、磷酸化、甲基化修饰等共同形成了“组蛋白密码”, 目前已经成为基因转录调控的研究焦点。“组蛋白密码”的变换即组蛋白的修饰, 根本上是对染色质结构的改变, 由结构的改变而影响功能, 从而影响基因的转录。随着对组蛋白研究的不断深入, 组蛋白各种共价修饰如乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化之间的密切关联必将浮出水面, 组蛋白各种修饰之间是如何协作以调控基因表达的谜底必将被揭开。

参考文献 (References)

- [1] Vijay-Kumar S *et al.* *J Biol Chem*, 1987, **262**: 6396
- [2] Chau V *et al.* *Science*, 1989, **243**: 1576
- [3] Thrower JS *et al.* *EMBO J*, 2000, **19**: 94
- [4] Hofmann RM *et al.* *Cell*, 1999, **96**: 645
- [5] Hershko A *et al.* *Annu Rev Biochem*, 1998, **67**: 425
- [6] Muratani M *et al.* *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, **4**: 192
- [7] Cecile M *et al.* *Annu Rev Biochem*, 2001, **70**: 503
- [8] Jentsch *et al.* *Nature*, 1987, **329**: 131
- [9] Jason LJ *et al.* *J Biol Chem*, 2005, **280**: 4975
- [10] Wood A *et al.* *Mol Cell*, 2003, **11**: 267
- [11] Koken MH *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 8865
- [12] Hwang WW *et al.* *Mol Cell*, 2003, **11**: 261
- [13] Baarends WM *et al.* *Dev Biol*, 1999, **207**: 322
- [14] Goldknopf IL *et al.* *J Biol Chem*, 1975, **250**: 7182
- [15] Robzyk K *et al.* *Science*, 2000, **287**: 501

- [16] Nickel BE *et al. Biochemistry*, 1989, **28**: 958
[17] Wang H *et al. Nature*, 2004, **431**: 873
[18] de Napoles M *et al. Dev Cell*, 2004, **7**: 663
[19] Fang J *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 52812
[20] Thorne AW *et al. EMBO J*, 1987, **6**: 1005
[21] Sun ZW *et al. Nature*, 2002, **418**: 104
[22] Davie JR *et al. Biochemistry*, 1990, **29**: 4752
[23] Xiao T *et al. Mol Cell Biol*, 2005, **25**: 637
[24] Ng HH *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 34655
[25] Henry KW *et al. Genes Dev*, 2003, **17**: 2648
[26] Chen HY *et al. J Biol Chem*, 1998, **273**: 13165
[27] Pham AD *et al. Science*, 2000, **289**: 2357
[28] Ogawa Y *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **336**: 204
[29] Chu F *et al. Mol Cell Proteomics*, 2006, **5**: 194
[30] Chung CH *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **266**: 633
[31] Swaminathan S *et al. Mol Biol Cell*, 1999, **10**: 2583
[32] Lee KK *et al. Mol Cell Biol*, 2005, **25**: 1173
[33] Ingvarsdottir K *et al. Mol Cell Biol*, 2005, **25**: 1162
[34] Mueller RD *et al. J Biol Chem*, 1985, **260**: 5147
[35] Cai SY *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 2828
[36] Emre NC *et al. Mol Cell*, 2005, **17**: 585
[37] Mimnaugh EG *et al. Cell Death Differ*, 2001, **8**: 1182
[38] Sun L *et al. Curr Opin Cell Biol*, 2004, **16**: 119
[39] Oliva R *et al. Nucleic Acids Res*, 1990, **18**: 2739
[40] Li W *et al. Biochem J*, 1993, **296**: 737
[41] Briggs SD *et al. Nature*, 2002, **418**: 498

Ubiquitination and Deubiquitination of Histone

Chun-Lei Song, Hong-Lin Liu*

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Ubiquitin (Ub) is ubiquitously distributed and highly conserved throughout eukaryotic organisms. Ubiquitination is one of the modifications in post-transcription of genes. Histone is a component of chromatin and plays a vital role in regulating gene expression. The ubiquitination of histone does not lead to proteolysis, which differs from classical pathway of ubiquitination of protein. Ubiquitinated histones can recruit nucleosome into chromatin, affect histone methylation and gene transcription, and are also involved in X chromosome inactivation. Ubiquitination and deubiquitination of histone is closely related to alteration of structure of chromatin and gene expression. There are synergistic and cascade effect among histone ubiquitination, deubiquitination, phosphorylation, acetylation and methylation.

Key words ubiquitin; histone; ubiquitination; deubiquitination

Received: May 8, 2006 Accepted: September 6, 2006

*Corresponding author. Tel: 86-25-84395106, E-mail: liuhonglin@263.net