

协同伴侣分子 CHIP 的 E3 连接酶活性及其生物学意义

张志清 钱令嘉*

(军事医学科学院卫生学与环境医学研究所, 天津 300050)

摘要 CHIP (carboxy terminus of Hsc70 interacting protein)是一种新发现的具有泛素化连接酶活性的协同分子伴侣,它 N 端有 TPR (the tetratricopeptide repeat)结构,可以和分子伴侣结合, C 端有 U-box 结构,具有 E3 酶功能。CHIP 可以介导一系列重要蛋白质的泛素化降解,从而维持细胞内蛋白质的质量。现就 CHIP 的结构和功能、CHIP 的底物特征、CHIP 的生物学作用以及 CHIP 在疾病发生中的可能作用做一综述。

关键词 CHIP; 分子伴侣; 泛素化; 协同伴侣分子

CHIP (carboxy terminus of Hsc70 interacting protein)是 Ballinger 等^[1]用亲环蛋白(cyclophilin)-40 3' 端包含 TPR (tetratricopeptide repeat)的一个片段筛选人心脏 cDNA 文库时发现的一种蛋白质,它 N 端有 TPR 结构,可以和分子伴侣结合, C 端有 U-box 结构,具有 E3 酶功能,它能够在热休克蛋白的协助下完成对细胞内错误折叠蛋白质的泛素化降解,从而调节细胞内蛋白质的质量。

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是一组分子量不等的酸性蛋白质(pI=5.10~6.15),广泛存在于所有植物、酵母菌、细菌和哺乳动物细胞内。各种应激因素包括高温、组织损伤、氧化剂、重金属、肿瘤、超低温^[2]甚至心理应激等都可以诱导热休克蛋白的产生。热休克蛋白,除作为分子伴侣参与细胞内一些重要蛋白质的构象、稳定之外,还能促进细胞增殖、参与细胞骨架的形成与修复、调控细胞凋亡以及调节酶的活性等功能。热休克蛋白修复和降解结构发生改变的蛋白质是在一系列小分子协同伴侣分子的协同作用下来实现的。这些小分子包括 HIP、HOP、HSP40、Bag-1、HSBP1、HSBP2 和 CHIP 等。热休克蛋白在体内对蛋白质结构的维持和功能的调节是依赖其 ATP 酶活性的。HIP 和 HSP40 可以激活 HSP70 的 ATP 酶活性,从而完成对错误折叠蛋白质的修复,而 BAG-1 和 CHIP 可以抑制 HSP70 的 ATP 酶活性,并且介导 HSP70 结合底物的泛素化蛋白酶体降解。

CHIP 的发现,是对热休克蛋白功能的一种完善,因此成为一个新的研究热点,因此本文就 CHIP 研究

的最新进展做一综述。

1 CHIP 的结构与功能

CHIP cDNA 编码 34.5 kDa 的蛋白质,在氨基端包含 3 个 34 个氨基酸的 TPR 结构,在羧基端包含一个 U-box 结构^[2],U-box 结构和指环结构很相似,它们缺少金属整合残基,通过分子内相互作用形成自身结构^[3],U-box 和指环在结构上的相似性,表明 U-box 可能具有和指环结构一样的功能,在蛋白质的泛素化降解中有作用。在 TPR 结构和 U-box 中间富含带电残基,并且含有 2 个潜在的核定位信号片段。CHIP 中间部分的功能目前还不清楚,但是它是 CHIP 通过 TPR 和其他蛋白质相互作用所必须的。对 CHIP 的氨基酸序列在种间进行同源比对发现,人的 CHIP 序列和鼠有 98% 的氨基酸相似率,和果蝇有 60% 的相似率。羧基端 94 个氨基酸和 U-box 在种间有 87% 的相似率^[1],属于高度保守区域。

CHIP 通过它的 TPR 结构域及其邻近的带电荷区(第一个氨基酸到 197 个氨基酸)和 HSP70 的羧基端(540~650 氨基酸)相互作用,HSP70 的这个区域也包含一个 TPR 结合结构域,这个结构域也能够和 Hop 相互作用^[4](图 1)。CHIP 具有和 HSP90 和 HSP70 结合的同等能力,主要通过抑制热休克蛋白的 ATPase 活性,抑制 ATP 水解,减弱底物结合和重新折叠,从而

收稿日期: 2007-12-05 接受日期: 2008-05-28

总后勤部十一五课题(No.06Z074)

* 通讯作者。Tel: 022-84655430, Fax: 022-84655062, E-mail:

newjia@vip.sina.com

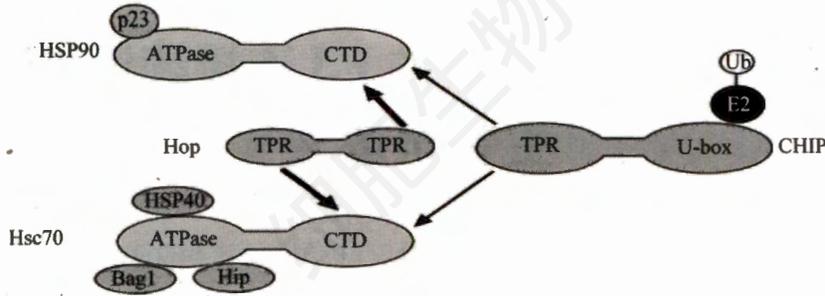


图1 CHIP结构及和热休克蛋白的相互作用示意图^[5]

CHIP 主要由 TPR 和 U-box 两个结构域组成, 它通过 TPR 结构和热休克蛋白相互作用, 而通过 U-box 实现泛素化连接酶功能。

抑制热休克蛋白对底物的折叠和重折叠过程。

U-box 结构具有和指环结构相似的功能, 因此 CHIP 可能和指环结构蛋白质一样具有泛素连接酶功能。多个实验证明 CHIP 在 HSP70、泛素、E1、E2 和蛋白酶体共同存在下在体外能够泛素化蛋白质^[2,6-8], 因此, CHIP 是第一个被确认的分子伴侣依赖的泛素化连接酶。CHIP 的泛素化连接酶功能和 UBC4/UBC5 家族一样, 必须依赖和 E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) 的相互作用^[2,6]。最近结构生物学实验同样证实, CHIP 首先是通过 TPR 结构和分子伴侣结合, 然后依赖 U-box 来实现泛素化功能的^[8,9]。

Northern 印迹分析表明 CHIP 主要位于代谢活动旺盛, 蛋白质容易发生错误折叠的区域, 如骨骼肌、心脏、脑等, 尽管在大多数组织都有表达, 例如胰腺、肝脏、肺、胎盘、肾脏等, 但是表达量较低^[1]。在通常状态下, CHIP 一般位于细胞质内^[1], 尽管也有发现表明 CHIP 片段位于核内^[7]。在应激状态下, CHIP 的定位问题目前还有很多争议, 需要做进一步的研究。

2 CHIP 的底物

研究发现, 在 HSP90 的底物中, 糖皮质激素受体, ErbB2、雌激素受体、雄激素受体、内皮氧化应激酶等都能够被 CHIP 介导进入泛素化降解^[10-15]。而且 HSP70 的底物也能够被 CHIP 介导进入泛素化降解^[16]。因此目前 HSP70 和 HSP90 的底物都可以看作是 CHIP 在体内生理条件下的潜在底物。

但是目前关于 CHIP 对蛋白质的降解的研究大多立足于在细胞内过表达 CHIP, 或者在体外的泛素化降解体系中进行。在这些体系中 HSP70 往往 6 倍于正常水平, CHIP 甚至 10 倍于正常水平^[7], CHIP 上调的生理环境或者 CHIP 是否就在生理水平下工作目前

仍然不清楚。因此, 不能得出 GR、CFTR 等一系列 CHIP 在体外降解的蛋白质是 CHIP 在体内的天然底物。

另一个问题就是 CHIP 底物是否依赖于 HSP90 或者 HSP70 的问题。已有实验表明^[2], CHIP 可以在体外不依赖分子伴侣的情况下泛素化 Raf-1。这说明 CHIP 单独识别底物也是可能存在的。Rosser 等^[17]的研究表明 CHIP 具有自己的分子伴侣功能, 而且这种功能也是热敏感性的, 在热应激条件下, 分子伴侣功能增强, CHIP 自身的分子伴侣功能可能有助于对错误折叠蛋白质的泛素化降解。

3 CHIP 的生物学作用

3.1 CHIP 对 HSP70 的调节作用

HSP70 在应激刺激下高表达, 这种高表达的机制是和 HSF1 相联系的。Dai 等^[18]在研究中发现, CHIP 除了一般认为的泛素连接酶作用, 而且可以促进 HSP70 和 HSF1 的解离, 进而促进 HSF1 的三聚化, 而且研究发现 CHIP 能够和 HSF1 共同迁移进入核内, 促进 HSF1 的 DNA 结合活性, 进而引起 HSP70 高表达。

其他研究发现^[19], CHIP 除了介导 HSP70 和 HSP90 底物的泛素化降解, 也能够泛素化 HSP70 和自身, 但是最初认为这种对 HSP70 和自身的泛素化不是一个降解的信号, 而是为了和它们底物一起被呈递给蛋白酶体。但 Qian 等^[20]发现 CHIP 不但能够泛素化 HSP70 的底物, 而且能够泛素化 HSP70。底物的泛素化是依赖于分子伴侣的, 当底物被蛋白酶体降解后, HSP70 也能够 CHIP 介导下被蛋白酶体降解, 从而使体内的 HSP70 恢复到正常水平。

研究表明, CHIP 不但能够和分子伴侣共同作用降解错误折叠蛋白质, 监控细胞内蛋白质质量, 而且

能够调节细胞内 HSP70 在应激前后下的表达水平。但是目前 CHIP 对分子伴侣的调控仅限于 HSP70, CHIP 对整个分子伴侣调控网络是否有调节作用还有待进一步研究。

3.2 CHIP 在信号转导通路中的作用

3.2.1 CHIP 对各种激素受体的调节作用 研究表明, CHIP 能够介导糖皮质激素受体^[10]、雌激素受体^[12]、雄激素受体^[13]的泛素化降解。这些受体在应激反应、性别分化与维持乃至这些激素介导的信号转导及细胞反应中都有重要作用, 因此 CHIP 在调控这些激素对器官、细胞的作用中具有重要意义, 但是这种调节作用是在什么生理作用下起作用的还有待进一步研究。而且, 这些激素受体都是 HSP70 和 HSP90 的底物, 所以细胞内还有哪些激素受体也是受 CHIP 调控的也有待进一步的研究。

3.2.2 CHIP 在细胞凋亡信号转导通路中的作用 p53 是一种在多细胞动物中具有高度进化保守性功能的蛋白质, 通常认为 p53 就像基因组的卫士, 而 Mdm2 (murine double minute 2) 就像这个卫士的杀手。Mdm2 可将 p53 泛素化, 而使其被蛋白酶体降解。Mdm2 是泛素化所涉及的 E1、E2、E3 三类酶中的 E3, 同属于泛素连接酶。许多研究发现, 错误折叠或者突变的 p53 可以和 HSP70 或者 HSP90 结合。因此, Esser 等^[21]研究了 CHIP 和 p53 的作用, 体外泛素化实验表明 CHIP 不但可以介导突变 p53 等的降解, 而且可以在 HSP70 的协助下完成对 p53 的降解。Tripathi 等^[22]通过体内实验表明 CHIP 在体内不但和突变的 p53 结合, 而且和野生的 p53 结合, 热应激能促进这种结合。CHIP 也可能是 p53 直接的伴侣分子, 从而在应激条件下协助错误折叠的 p53 回复天然状态。这一结果证明 CHIP 在 p53 通路中对于维持细胞功能具有重要意义。

ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) 是一种随细胞应激不同而表达的一种 MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase), ASK1 磷酸化 JNK (c-Jun N-terminal kinase) 的 N 端, 从而引发凋亡反应。ASK1 在应激所引起的细胞反应中起重要作用。HSP70 可以结合 ASK1 的 N 端阻止热应激条件下 ASK1 的二聚化, 从而阻止了依赖 ASK1 的细胞凋亡。ASK1 有一个 TPR 结合域, CHIP 能够和 ASK1 结合, Hwang^[23]等的研究表明, CHIP 可以泛素化降解 ASK1, 从而降低 ASK1 依赖的细胞凋亡。用 RNA 干扰(RNAi)技术干涉 CHIP 的表达, 可以降低 JNK 的表

达。并且深入研究表明 CHIP 可以引发和 ASK1 共同起作用的死亡结构域相关蛋白(Daxx)向核内迁移, 从而触发抗凋亡反应。

二重亮氨酸支撑点激酶(dual leucine zipper-bearing kinase, DLK)是一种属于丝氨酸/苏氨酸激酶家族的 MAPKKK, 它是 MLK (mixed lineage kinase) 家族的一员。MLK 在细胞内的一种重要功能是磷酸化并激活 JNK。另外 MLK 在神经细胞的凋亡中具有重要作用。Daviau 等^[24]的研究表明, DLK 可以被 CHIP 在 HSP70 介导下降解。

目前 CHIP 在细胞凋亡通路中的作用研究仍然比较少。而 HSP70 和 HSP90 在细胞凋亡的多个过程都有重要作用, 所以 CHIP 在细胞凋亡通路中和热休克蛋白相关蛋白的相互作用还有待进一步研究。

3.2.3 CHIP 在 TGF- β 通路中的作用 TGF- β 通路是一条非常重要的信号转导通路, 它在细胞的分化、分裂、凋亡中具有重要作用。Li 等^[25]用酵母双杂交方法发现 CHIP 和 smad1/4 相互作用调节骨形态发生蛋白信号通路。Xin 等^[26]证明 CHIP 对 TGF- β 通路有调节作用, 首先他们过表达 CHIP 发现抑制了 TGF- β 通路的敏感性, 而用 RNAi 技术干扰 CHIP 表达可以提高 TGF- β 通路的敏感性。然后他们发现 CHIP 对 TGF- β 通路的调节是通过对 smad3 的泛素化调节来实现的。

4 CHIP 泛素化作用的调控

CHIP 作为 E3 连接酶依赖于热休克蛋白完成对错误折叠蛋白质的泛素化降解, 从而维持细胞正常的功能。但人们对这种过程的调节仍然知之甚少, 最近的研究发现, 一些和热休克蛋白相互作用的蛋白质在 CHIP 介导的泛素化降解中有重要的调节作用。

BAG-1 早已被证明在蛋白质依赖蛋白酶体的泛素化降解中有呈递作用。BAG-1 通过它的氨基端和蛋白酶体结合, 并且它和蛋白酶体的结合依赖 ATP 的参与。CHIP 有可能和 BAG-1 一起将底物呈递给蛋白酶体。免疫共沉淀证实这两种协同分子伴侣可以直接相互作用, 添加 HSP70 后可以增加 CHIP 在沉淀复合物中的数量^[27]。

单独过表达 BAG-1 不能提高分子伴侣底物的降解速率, 但是 CHIP 和 BAG-1 共表达能够提高这些底物的降解, 这说明就对将底物蛋白向蛋白酶体呈递而论, CHIP 和 BAG-1 是共同起作用的。BAG-1 促进 HSP70 结合底物的释放, 并且可以和 CHIP 一起将底

物呈递蛋白酶体,完成泛素化降解^[4]。

HSBP1是一种结合在HSP70 N端的一个蛋白质,它抑制HSP70的ATPase活性^[28]。研究表明,HSBP1通过阻止分子伴侣和协同分子伴侣复合物的形成从而抑制CHIP的泛素化作用。

BAG-2是另外一种和分子伴侣相互作用的蛋白质,Arndt等^[29]发现BAG-2和BAG-1不同,BAG-2能够阻抑CHIP的泛素化过程。它的阻抑机制和HSBP1不同,主要通过阻抑CHIP、分子伴侣复合物和E2的结合,从而阻止泛素化过程的进行。Dai等^[30]的试验也证明了这一结论。

5 CHIP在疾病发生中的作用

CHIP在细胞内作用的阐明有利于说明细胞内蛋白质折叠-重折叠和蛋白质降解两条通路之间的联系机制,这两条通路对于保持细胞内蛋白质质量,维持细胞正常生命活动具有重要意义。

尽管CHIP和病理生理之间的联系还有待进一步的研究,但是目前的研究初步表明CHIP和一些人类疾病还是有一定联系的。

5.1 CHIP与神经退行性疾病

CHIP功能的进一步阐明能够推动对蛋白质质量控制机制的理解,这有利于阐明由于一些蛋白质错误折叠聚集而引起退行性疾病,比如:帕金森病中的Lewy小体、阿尔茨海默病中的纤维神经瘤、多聚谷氨酰胺病(polyglutamine-repeat)中的泛素阳性内含物。事实上,目前的研究已经提供了CHIP和帕金森病有直接联系的病理生理学证据。在青少年帕金森病中,Parkin基因的突变能够导致多巴胺神经元的缺失和与帕金森病相关的必然的运动缺陷。

Parkin是一种指环结构的E3连接酶,PaelR(the membrane receptor for Pael)是Parkin的一个底物。当Parkin突变时,PaelR发生聚集,这被认为是导致帕金森病的病理学原因。Parkin降解错误折叠PaelR需要CHIP的参与。CHIP能够促进PaelR从Hsc/HSP70的释放,只有释放发生后,Parkin才能完成对PaelR的降解^[31]。

尽管CHIP和Parkin各自的泛素化活性是如何协同作用来引发对PaelR的降解目前仍然不清楚,但是这两个蛋白质应该在保护神经细胞死亡方面具有协同作用。无论如何,这些结果证明CHIP在和神经退行性疾病发生相关蛋白的质量监控中有重要作用,有关CHIP在神经退行性疾病中的作用Goryunov等^[32]

和Dickey等^[33]做了很好的综述。

5.2 CHIP与心血管疾病

作为在清除错误折叠蛋白质过程中的主要参与者,CHI可能在对慢性应激易感的细胞或组织中也有保护作用。比如,CHIP在心肌细胞的高表达^[1]可能反映CHIP在心肌细胞保护中有作用。alphaB基因的特定突变导致alphaB蛋白在细胞内的错误折叠,从而引起分子伴侣和CHIP在扩张性心肌病细胞内的高度聚集。充血性心力衰竭和致死性心律不齐就是由于alphaB蛋白沉积所导致的^[34]。这表明CHIP可能在alphaB基因的特定突变导致的心脏疾病中具有重要意义。Zhang等^[35]也证明了CHIP在心肌梗塞中对心肌细胞的保护作用,但它的机制还有待进一步深入研究。

高血糖能够引起糖尿病型心脏衰竭,转录因子GATA4对于心脏保持内稳态是非常重要的,研究发现,在高血糖能够引起的糖尿病型心脏衰竭中,GATA4的表达量降低,相反,高表达GATA4,可以减轻心脏衰竭症状,进一步研究证明,CHIP在高血糖引起的糖尿病型心脏衰竭中表达量升高,CHIP的过表达能够引起GATA4的泛素化降解。抑制CHIP表达后,GATA4的表达量提高,高血糖能够引起的糖尿病型心脏衰竭症状减轻^[36]。这表明CHIP对于某些心血管病的发生可能具有另一方面的作用,其机制有待于进一步研究。

5.3 CHIP与其他疾病

研究发现,CHIP在热应激、基因毒应激、氧化应激、内质网和蛋白酶体应激^[37]等多种应激条件下,CHIP的表达明显升高,这可能是细胞对外界环境的一种自我防御机制,其机制有待于进一步研究。这对于研究各种应激性疾病的产生和预防提供了新的思路。另外,CHIP在细胞凋亡信号转导通路中的作用,对于研究CHIP在肿瘤发生和治疗中的研究提供了很好的启示。

6 小结

目前,CHIP作为一个协同伴侣分子和E3连接酶已成为共识,但关于CHIP依然有很多方面值得研究。CHIP在细胞内到底有多少底物,它对于底物的选择性有什么规律目前仍然不是很清楚。CHIP自身的表达调控机制也有待于进一步研究。目前研究发现,CHIP通过在细胞内降解错误折叠蛋白质,维护细胞内蛋白质质量,从而保持细胞内稳态,并且现有

研究已经证明CHIP在多个信号转导通路具有广泛作用, 这些为深入理解CHIP降解分子伴侣依赖蛋白质的生理和病理学意义提供了新的视角, 也为CHIP作为多种疾病的药物靶标提供了可能性。

参考文献(References)

- [1] Ballinger CA *et al. Mol Cell Biol*, 1999, **19**: 4535
- [2] Murata S *et al. EMBO Rep*, 2001, **2**: 1133
- [3] Aravind L *et al. Curr Biol*, 2000, **10**: 132
- [4] Demand J *et al. Mol Cell Biol*, 1998, **18**: 2023
- [5] Murata S *et al. Int J Biochem Cell Biol*, 2003, **35**: 572
- [6] Jiang J *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 42938
- [7] Meacham GC *et al. Nat Cell Biol*, 2001, **3**: 100
- [8] Xu Z *et al. Biochemistry*, 2006, **45**: 4749
- [9] Zhang M *et al. Mol Cell*, 2005, **20**: 525
- [10] Xu W *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 12847
- [11] Christopher P *et al. Arch Biochem Biophys*, 2003, **410**: 134
- [12] He B *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 30643
- [13] Jiang J *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 49332
- [14] Morishima Y *et al. Biochemistry*, 2005, **44**: 16333
- [15] Peng HM *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 52970
- [16] Shin Y *et al. J Biol Chem*, 2005, **280**: 23727
- [17] Rosser MF *et al. J Biol Chem*, 2007, **282**: 22267
- [18] Dai Q *et al. EMBO*, 2003, **22**: 5446
- [19] Hatakeyama S *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 33111
- [20] Qian SB *et al. Nature*, 2006, **440**: 551
- [21] Esser C *et al. J Biol Chem*, 2005, **280**: 27443
- [22] Tripathi V *et al. J Biol Chem*, 2007, **282**: 28441
- [23] Hwang JR *et al. Cell Stress Chaperones*, 2005, **10**: 147
- [24] Daviau A *et al. J Biol Chem*, 2006, **281**: 31467
- [25] Li L *et al. Mol Cell Biol*, 2004, **24**: 856
- [26] Xin H *et al. J Biol Chem*, 2005, **280**: 20842
- [27] Demand J *et al. Curr Biol*, 2001, **11**: 1569
- [28] Alberti S *et al. Mol Biol Cell*, 2004, **15**: 4003
- [29] Arndt V *et al. Mol Bio Cell*, 2005, **12**: 5891
- [30] Dai Q *et al. J Biol Chem*, 2005, **280**: 38673
- [31] Imai Y *et al. Mol Cell*, 2002, **10**: 55
- [32] Goryunov D *et al. J Clin Invest*, 2007, **117**: 590
- [33] Dickey CA *et al. Trends Mol Med*, 2007, **13**: 32
- [34] Vicart P *et al. Nat Genet*, 1998, **20**: 92
- [35] Zhang C *et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, **288**: H2836
- [36] Kobayashi S *et al. J Biol Chem*, 2007, **282**: 21945
- [37] Dikshit P *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **357**: 761

E3 Ligase Activity of CHIP, a Cochaperones and Its Biological Significance

Zhi-Qing Zhang, Ling-Jia Qian*

(Institute of Health and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300050, China)

Abstract CHIP, carboxy terminus of Hsc70 interacting protein, is a new co-chaperone with E3 ligase activity discovered recently. It had the tetratricopeptide repeat (TPR) domain at its amino terminus and could interact with chaperones, and it had E3 ligase activity with a U-box domain at its carboxy terminus. CHIP could play a E3 ligase role during a series of protein degradation to control proteins quality in the cell. The structure and ability, client substrates, biological characterization and roles in illness of CHIP were reviewed in this paper.

Key word CHIP; chaperone; ubiquitination; cochaperone

Received: December 5, 2007 Accepted: May 28, 2008

This work was supported by the Eleven Five Project of General Logistics Department (No.06Z074)

*Corresponding author. Tel: 86-22-84655430, Fax: 86-22-84655062, E-mail: newjia@vip.sina.com