

UEV 蛋白,一个保守的类泛素结合酶蛋白家族

冯 强 冯朝晖 余应年

浙江大学医学院病理生理学教研室 杭州 310013

摘要 泛素(Ubiquitin)是一个高度保守的蛋白。泛素结合酶参与各种真核生物的代谢过程。泛素结合过程中所必需的泛素结合酶在真核生物中是高度保守的。近几年来,人们发现了一组与泛素结合酶具有较高同源性的蛋白,包括 MMS2,CROC-1 等。但这组蛋白都不具有泛素结合酶与泛素结合的活性半胱氨酸残基,它们被命名为泛素结合酶变体蛋白(Ubiquitin-conjugating E₂ enzyme Variant UEV)。有实验表明,UEV 蛋白参与真核生物的细胞分化,细胞周期调节,DNA 修复等过程,而且与肿瘤发生有关。UEV 蛋白的发现提示,泛素结合过程可能存在着一种新的调节过程。

关键词 泛素;泛素结合酶变体蛋白;MMS2;CROC-1

泛素是一种高度保守的,含 76 个氨基酸的蛋白,常常是通过与其它蛋白进行共价结合而发挥生物学作用。泛素结合酶参与多种真核生物的代谢过程,包括核糖体的合成,酵母交配型(mating type)的调节,细胞周期的调控,DNA 的修复,以及其他的过程。泛素与泛素激活酶(E₁)结合后被激活,能够与泛素结合酶(Ubiquitin conjugating enzyme,UBC 或 E₂)上的半胱氨酸残基形成硫酯键而相结合,UBC 再将泛素传递给靶蛋白。在某些反应中,还需要泛素连接酶(Ubiquitin ligase enzyme, E₃)帮助 UBC 确定特定的靶蛋白⁽¹⁾。真核生物 UBC 的氨基酸序列是高度保守的,尤其是在与泛素结合的活性半胱氨酸残基及其周围区域序列⁽²⁾,它们的核心三级结构也是保守的⁽³⁾。

1997 年,人们得到了一个能够转录激活 *f α* 基因启动子的蛋白 CROC-1⁽⁴⁾。之后,又在从酵母到人的各种真核生物中发现了 CROC-1 的同源蛋白,包括 MMS2,hMMS2,W99958,L77699,AA246265,CeY54E5,U37919,T88528,L38756⁽⁵⁾。人们主要对 CROC-1,MMS2,hMMS2 进行了研究发现这些蛋白不仅彼此之间具有较高的同源性,而且这些蛋白与 UBC 也有显著的氨基酸序列同源性,它们的大小、二级和三级结构也与 UBC 相似。但是这些蛋白不具有 UBC 高度保守的泛素结合基序中的活性半胱氨酸残基,因此也就没有 UBC 结合泛素的活性。此外,还发现这些蛋白在一些生物功能中是可以相互替代的,因此有人认为这些蛋白属于一个保守的类泛素结合

酶蛋白家族⁽⁶⁾,也有人称它们为泛素结合酶变体蛋白(Ubiquitin-conjugating E₂ enzyme Variant UEV)⁽⁵⁾。下面就将这一新蛋白家族中的 MMS2,CROC-1 的有关分子生物学研究进展做一简要的综述。

1 MMS2 和 hMMS2

1.1 MMS2

MMS2 是酵母中的 UEV 蛋白,它是因为能够对酵母的 *mms2-1* 突变进行功能互补而被分离的⁽⁷⁾。MMS2 又称为 YG17-YEAST⁽⁵⁾ 或 YGL087C⁽⁸⁾。*mms2* 基因定位于酵母染色体 7,位于 *mad1* 和 *snr10* 之间,含有一个内含子。位于内含子中的一段剪接序列是高度保守的⁽⁷⁾。

MMS2 蛋白有 137 个氨基酸,分子量 15.5 KDa。实验发现第一个外显子所编码的 3 个氨基酸对 MMS2 非常重要,因为去除了第一个外显子后,MMS2 就不能够弥补 *mms2-1* 突变株的 MMS 敏感性性状。MMS2 的 C 端三分之二的片段与几乎所有的 UBC 有着显著的同源性,同 UBC 一样,也富含脯氨酸(在 137 个氨基酸中占 12 个),尤其是中间的三分之一部分(在 41 个氨基酸中占 8 个)。但如前所述,MMS2 缺乏 UBC 中关键的活性半胱氨酸残基及其周围的保守序列。

在酵母中有 3 个 DNA 修复上位群,分别是 RAD3,RAD6,RAD52⁽⁹⁾。其中,RAD6 群中的 *rad6*

基因编码 UBC2 蛋白。而 *mms2* 无义突变可引起酵母对甲磺酸甲酯 (MMS) 和 UV 中等程度的敏感性,联系到 MMS2 与 UBC 的相似性,人们就会联想到: MMS2 是否会在 RAD6 DNA 修复途径中起作用? 已有证据表明: *mms2* 无义突变所引起的 MMS 和 UV 敏感性,其敏感程度与 RAD6 途径突变是相似的; *mms2* 突变下位于 *rad* 和 *rad18* 突变 (RAD18 以与 RAD6 形成复合物的形式参与 RAD6 途径⁽¹³⁾),而与 *rad4* 和 *rad50* 突变具有叠加性 (RAD4、RAD50 分别属于 RAD3 和 RAD52 DNA 修复途径⁽⁹⁾); MMS2 与 UBC 的同源性,它可能参与 RAD6 途径所需的泛素化作用。所以人们认为 MMS2 参与 RAD6 途径⁽⁷⁾,但是 RAD6 途径又有无错复制后修复 (error-free postreplication repair) 和诱变 (mutagenesis) 两条途径。MMS2 具体在哪一条途径中发挥作用呢? 我们有二条理由认为 MMS2 参与无错复制后修复途径⁽⁷⁾: *mms2* 突变并不影响 REV3 所参与的自发性和 UV 所致的诱变 (*rev3* 基因编码一种非必需性 DNA 聚合酶的催化亚单位⁽¹⁰⁾, *pol* 参与诱变途径,它可使停滞于 DNA 模板损伤处的复制机器绕过阻滞处,从而使突变率上升⁽¹¹⁾)。关于 MMS 和 UV 敏感性, *mms2* 突变与 *rev3* 突变有协同作用。还有实验表明, *mms2* 突变可能导致无错复制后修复途径的完全失活⁽⁷⁾。又有实验表明, MMS2 同源蛋白 hMMS2 (下详) 的过量表达,仅能使 *mms2* 突变株对 MMS 的抵抗力恢复到野生株的水平,而不能使之提高。这说明 MMS2 可能并不是无错复制后修复途径中的限制性因素⁽⁶⁾。此外, *mms2* 突变还可使酵母的自发突变率上升 30 倍以上 (这可能是因为无错复制后修复途径阻断,使所有的自发性损伤进入诱变途径所致⁽⁷⁾)。所以 *mms2* 基因可能是酵母中被报道过的最显著的增变基因。

1.2 hMMS2

hMMS2 是人的 MMS2 同源物,又记为 DDvit⁽¹²⁾, HsUEV - 2⁽⁵⁾, HsVITDITR⁽⁸⁾, EDPF - 1⁽⁶⁾。hMMS2 基因尚未在染色体上定位。hMMS2 CDNA 全长 1535bp。编码蛋白有 145 个氨基酸,分子量 16.4 kDa。它的氨基酸序列有 50.4% 与 MMS2 一致 (69/137),尤其它 N 端一半的氨基酸序列有 65% 的相同 (45/69)⁽⁶⁾。hMMS2 含有 3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (氨基酸 67, 82, 116), 1 个酪蛋白激酶磷酸化位点 (氨基酸 59), 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点 (氨基酸 58), 2 个十四烷酰化位点 (氨基酸 28,

92)。这么多的磷酸化位点,说明磷酸化可能对 hMMS2 的生物学作用进行调节。对 hMMS2 进行结构分析表明 hMMS2 不具有疏水性区域,说明 hMMS2 是一种胞质蛋白,而不是膜蛋白⁽¹²⁾。

实验表明, hMMS2 不仅可以补偿酵母 *mms2* 突变株的 MMS 和 UV 敏感性,也可以补偿该突变造成的自发突变率升高⁽⁶⁾,这说明, hMMS2 可能参与人细胞内保守的 DNA 无错复制后修复途径。

hMMS2 之所以又叫做 DDvit1,是因为 Fritsche 等人⁽¹²⁾ 曾通过维生素 D₃ 诱导人血单核细胞得到的 hMMS2 的 mRNA 转录物。Fritsche 等人的研究表明, hMMS2 编码蛋白可能参与维生素 D₃ 诱导单核细胞和肠细胞进行分化所需的细胞内信号传递。

2 CROC - 1

CROC - 1 是人的另一个 UEV 蛋白。它是因为能够转录激活 *fos* 启动子而被分离出来的,又称为 hsUEV - 1⁽⁵⁾。croc - 1 基因定位于染色体 20q13.2 区带,至少含有 6 个外显子。此外还发现在染色体 1、2、7 上可能存在 *croc - 1* 的假基因或与它相关的基因。人们发现 *croc - 1* 基因有四种不同型式的转录物,这可能是因为 *croc - 1* 基因的 3 端不翻译片段中的 3 个聚腺苷酸位点被分别利用,以及进行不同方式剪接的结果。与这四种转录物相对应的蛋白产物分别为 CROC - 1A, CROC - 1AS, CROC - 1B, CROC - 1BS。各种类型细胞至少表达其中的一种。它们的 C 端的 90 个氨基酸是一致的,其中包含了与 UBC 的泛素结合域具有同源性的区域。它们的 N 端却是各不相同的。鉴于各种 UBC 所具有的各自不同的 C 端或 N 端参与这些 UBC 的生物作用,如选择特异的底物或细胞内定位^(13,14),因此这四种 CROC - 1 的剪接变异蛋白所具有的各自不同的 N 端也可能与它们的生物学作用特异性有关⁽⁵⁾。

人们对 CROC - 1B 作了较多的研究,发现它具有二分性结构: N 端为酸性结构域, C 端为碱性结构域⁽⁴⁾。CROC - 1B 与 MMS2, hMMS2 分别具有 49%⁽⁷⁾ 和 91.5%⁽⁶⁾ 的氨基酸序列一致。它的中心区域 (氨基酸 116 - 173) 与 UBC 具有较高的同源性。但是与 MMS2, hMMS2 一样, CROC - 1B 也不具有活性的半胱氨酸残基,而是用一个缬氨酸残基代替了。CROC - 1B 的 C 端的一个区域 (氨基酸 197 - 214) 与转录起始因子 IF - D 的亚基 - TAF 250 所具有的 DNA 结合域 (氨基酸 1225 - 1248) 有 41.7%

一致和 37.5% 由相似氨基酸替代。CROC - 1B 在其碱性结构域的起始位置还有相互重叠的 cAMP 依赖性蛋白激酶和 Ca²⁺ - 钙调蛋白依赖性蛋白激酶的磷酸化位点(氨基酸 136 - 140)⁽⁴⁾。

实验表明,CROC - 1 主要分布在细胞核内,联系到 CROC - 1B 具有与 TAF₂₅₀DNA 结合域相似的结构以及其酸性结构域可能参与转录激活。因此它可能有转录因子的功能。但尚未发现 CROC - 1 与 DNA 片段的特异性结合⁽⁴⁾。

CROC - 1 可以通过某个信号通路转录激活 *f_{os}* 启动子。实验表明,该信号通路必须具有 DNA 的直接重复增强子序列(direct repeat enhancer sequence)⁽⁴⁾。又有实验发现,MMS2 和 hMMS2 也都可以转录激活 *f_{os}* 启动子,不过 MMS2 的激活能力与 CROC - 1 相似,而 hMMS2 的激活能力则较低一些⁽⁶⁾。

CROC - 1 还可以转录激活 RAF 效应启动子 *mdr - 1*⁽⁴⁾,这表明 CROC - 1 可能参与一系列 RAF 激活基因的转录激活,这些基因与细胞的增殖和耐药性有关。

在 *croc - 1* 转染的 HT - 29 - M6 细胞中的 CROC - 1 组成性表达,可以抑制细胞接触性诱导的分化,并引起更大比例的细胞进入细胞周期,并使细胞停留在 G₂ - M 期,伴有核内再复制的出现,这说明 CROC - 1 可能参与细胞分化和细胞周期的调控。细胞停留在 G₂ - M 期,并有核内再复制出现,说明 CROC - 1 的组成性表达可使细胞周期的转换过渡发生故障⁽⁴⁾。实验发现,内源性 *croc - 1* 的达是周期性的:G₁ - S 期表达量最高,之后开始下降,S 期末和 G₂ - M 期降到最低点,几乎难以检测到。细胞进入有丝分裂后,表达量又逐渐上升。这不仅说明 CROC - 1 可能参与细胞周期转折的调节;也说明,不是 CROC - 1 的高表达量,而是其不适时表达破坏了对细胞分化和细胞周期的正常调控。还发现,*croc - 1* 转染的细胞中,有丝分裂激酶 CDK - 1 的表达量虽然没有改变,但其活性却明显下降。鉴于人类免疫缺陷病毒 HIV 的 VPR 蛋白和 SV40 的大 T 蛋白可以通过抑制 CDK1,使细胞停滞在 G₂ - M 期,从而导致无有丝分裂下的多重复复制及多倍体的出现,有人认为,*croc - 1* 转染细胞停留在 G₂ - M 期及核内再复制出现是 CROC - 1 抑制 CDK1 活性的结果⁽⁵⁾。其抑制机制尚不清楚。不过当 VPR 蛋白抑制 CDK1 活性时,是与其催化亚基 P34^{cdc2} 的过磷酸化有关。

与 hMMS2 相同,CROC - 1 也可以对酵母 *mms2* 突变株的 MMS 和 UV 敏感性进行互补⁽⁸⁾。联系到 CROC - 1 与 hMMS2 有 91.5% 的氨基酸序列一致性,使人们想到人的 RAD6 的 2 个同源蛋白 HR6A 和 HR6B。它们有 95% 的氨基酸序列一致性,并且能够对 rad6 DNA 修复和诱变缺陷进行补偿。因此有人认为 CROC - 1 与 hMMS2 一样,也在 DNA 无错复制后修复途径中发挥作用,而以上所观察到的 CROC - 1 对细胞的各种影响,都来自它在 DNA 修复中的作用⁽⁶⁾。因已知细胞的 G₂ 期延误和 P34^{cdc2} 过磷酸化与细胞对 DNA 损伤因子的抵抗力相关⁽¹⁵⁾;且 *f_{os}* 启动子的活性与保护细胞免受 DNA 损伤因子损害有关,而其保护作用可能要通过复制后修复途径实现⁽¹⁶⁾。

因此,我们似乎可以这样认为,虽然 hMMS2 和 CROC - 1 在细胞中的作用不只限于复制后修复,但它们在生化过程中所发挥的基本作用是与 MMS2 相似的⁽⁶⁾。

3 hMMS2、CROC - 1 与肿瘤发生

通过对 MMS2、hMMS2、CROC - 1 的研究,我们可以大致了解到,UEV 蛋白是一族在结构上、功能上都保守的蛋白。它们可能参与细胞分化,细胞周期调节以及 DNA 修复等过程。由于它们在 UBC 有着相当高的同源性,那么它们的生物学功能是否与泛素系统有关呢!已证明一些 UBC 因为其活性半胱氨酸残基被替代而失去活性,但是这些失活的 UBC 可以作为正常 UBC 的显性负性变体而有效地抑制正常 UBC 所进行的泛素化作用⁽¹⁷⁾。此外,人们对 TSG101(它是一种与 UEV 蛋白相似的蛋白,其 N 端与 UBC 有同源性,但也缺少 UBC 所必须的活性半胱氨酸残基。但并不属于 UEV 蛋白⁽⁷⁾)的研究指出:TSG101 可能是 UBC 的显性负调节子^(18,19)。因此,人们认为 UEV 蛋白也可能参与对蛋白泛素化的调节。因为 UBC 可以彼此相互作用,形成同二聚体或异二聚体⁽²⁰⁾,从而调节这些 UBC 的活性和/或底物特异性。所以,UEV 可能是以与特定的 UBC 形成异二聚体的形式,对这些特定的 UBC 的泛素化作用进行正性或负性调节。比如说,MMS2 参与 RAD6 途径的方式可能是 MMS2 与 RAD6 形成异二聚体,然后将 RAD6 - RAD18 复合物带向复制后修复途径。实验发现:酵母 *mms2* 突变株在 RAD6 参与的氨基末端规律蛋白降解和孢子形成两方面都有部分缺陷。

这也证明了 MMS2 与 RAD6 有着物理性相互作用⁽⁷⁾。

有实验发现,在进行分化的 HT-29-m6 细胞中,CROC-1 表达下降⁽⁵⁾,而在无限增殖化的经 SV40 转化的人胚肾细胞中,CROC-1 表达上调⁽²²⁾;hMMS2 的转录水平在大多数正常组织中是很低的,但在某些人类肿瘤细胞系中,有着波动的但显著升高的转录水平;CROC-1 的表达水平在被检查的肿瘤细胞中都有提高,如肺癌 A549、黑色素瘤 G361、结肠癌 SW480 等⁽⁶⁾;同时 *croc-1* 基因所在的染色体 20q13.2 区带在乳腺癌中常有 DNA 扩增⁽²¹⁾。这些结果提示,UEV 蛋白与某些肿瘤发生有一定关系。这其中也许存在着一个新的癌变发生机制有待于我们作进一步的探究。

参考文献

- 1 Finley D, Chau V. Ubiquitination. *Annu Rev Cell Biol*, 1991;7:25
- 2 Jentsch S. The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet*, 1992;26:179
- 3 Cook WJ, Martin PD, Edwards BF, et al. Crystal structure of a class I ubiquitin conjugating enzyme (UbcT) from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.9 angstroms resolution. *Biochemistry*, 1997;36:1621
- 4 Rothfok ML, Lin SL. CROC-1 encodes a protein which mediates transcriptional activation of the human Fos promoter. *Gene*, 1997;95:141
- 5 Sancho E, Vila MR, Sanchez-Pulido L. Role of UEV-1, an inactive variant of E2 ubiquitin-conjugating enzymes, in *in vitro* differentiation and cell cycle behavior of HT-29-M6 intestinal mucosecretory cells. *Mol Cell Biol*, 1998;18:576
- 6 Xiao W, Lin SL, Broomfield S, et al. Structural and functional conservation of a UBC-like protein family from yeast to human cells. *J Biol Chem*, 1998; in press
- 7 Broomfield S, Chew BL, Xiao W. MMS2, encoding a UBC-like protein, is a member of the yeast error free postreplication repair pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; in press
- 8 Thomson TM, Khalid H, Lozano JJ, et al. Role of UEV-1A, a homologue of the tumor suppressor protein TSG101, in protection from DNA damage. *FEBS Letters*, 1998;423:49
- 9 Prakash S, Sung P, Prakash L. DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*, 1993;27:33
- 10 Morrison A, Christensen RB, Alley J. REV3, a *Saccharomyces cerevisiae* gene whose function is required for induced mutagenesis, is predicted to encode a nonessential DNA polymerase. *J Bacteriol*, 1989;171:5659
- 11 Friedberg EC, Walker G, Siede W. DNA Repair and Mutagenesis. *ASM Press* Washington, DC:1995
- 12 Fritsche J, Rehli M, Kranse SW, et al. Molecular cloning of a 12, 25-dihydroxyvitamin D3-inducible transcript (DDvit) in human blood monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997;235:407
- 13 Bailly V, Lamb J, Sung P, et al. Specific complex formation between yeast RAD6 and RAD18 proteins: a potential mechanism for targeting RAD6 ubiquitin-conjugating activity to DNA damage site. *Genes & Devel*, 1994;9:811
- 14 Potluk ZW, McDonough M, Sangan P, et al. Novel CDC34 (UBC3) ubiquitin-conjugating enzyme mutants obtained by charge-to-alanine scanning mutagenesis. *Mol Cell Biol*, 1995;15:1210
- 15 Cohen-Jonathan E, Tonlas C, Monteil S, et al. Radioresistance induced by the high molecular forms of the basic fibroblast growth factor is associated with an increased G2 delay and hyperphosphorylation of P34CDC2 in HeLa cells. *Cancer Res*, 1997;57:1364
- 16 Kaina B, Haas S, Kappes H. A general role for c-FOS in cellular protection against DNA-damaging carcinogens and cytostatic drugs. *Cancer Res*, 1997;57:2721
- 17 Banerjee A, Deshajes RJ, Chau V. Characterization of a dominant negative mutant of the cell cycle ubiquitin-conjugating enzyme cdc34. *J Biol Chem*, 1995;270:26209
- 18 Koonin EV, Abagyan RA. TSG101 may be the prototype of a class of dominant negative ubiquitin regulators. *Nat Genet*, 1997;16:330
- 19 Ponting CP, Cai YD, Bork P. The breast cancer gene product TSG101: a regulator of ubiquitination? *J Mol Med*, 1997;75:467
- 20 Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, et al. P53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response to tumor cells. *Genes & Devel*, 1996;10:2438
- 21 Brinkmann N, Callo M, Polymeropoulos MH, et al. The human (CAS cellular apoptosis susceptibility) gene mapping on chromosome 20q13 is amplified in BT474 breast cancer cells and part of aberrant chromosomes in breast and colon cancer cell lines. *Genome Res*, 1996;6:187
- 22 Xiao W. 个人咨询

(1999-02-28 收稿;1999-03-12 接受)