

真核细胞蛋白酶体研究进展

李媛 梁俊玉 武国凡 杨宁*

(西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070)

摘要 蛋白酶体作为蛋白酶家族中一个复杂成员, 在真核细胞、古细菌和一些真细菌中均有发现。真核细胞蛋白酶体在蛋白质质量控制和细胞稳态维持中起关键作用, 同时涉及多种细胞活动, 包括细胞周期运行和抗原提呈等。对真核细胞蛋白酶体在疾病治疗中的作用机制和相关靶点药物的研发已引起了广泛关注。该文综述了真核细胞蛋白酶体结构与功能相关的研究进展, 重点阐述了不同形式20S核心颗粒(20S core partical, 20S CP)和不同种类调节颗粒间的相互作用。

关键词 蛋白酶体; 20S核心颗粒; 调节颗粒; 泛素

Research Progress on Eukaryotic Proteasome

Li Yuan, Liang Junyu, Wu Guofan, Yang Ning*

(College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract As a complex member of the protease family, proteasome is found in eukaryotic cells, also in archaea and in some eubacteria. In the eukaryotic cells, we now know its activity is central to protein quality control and cell homeostasis sustain, involved in many cellular functions including cell cycle progression and antigen presentation. The role of the treatment of related diseases and the development of target drugs have attracted more attention gradually. This review attempts to summarize the research progress on structure and functions of proteasome in eukaryotes, especially on the specific interactions of 20S core partical with its activators.

Keywords proteasome; 20S core partical; regulatory partical; ubiquitin

真核细胞蛋白酶体(proteasome)包括了由一个20S核心颗粒(20S core partical, 20S CP)和不同种类调节颗粒(regulatory partical, RP)或称蛋白酶体激活因子(proteasomal activator, PA)组成的多种复合体^[1-2], 可以特异性识别和降解多种蛋白质底物, 特别是不稳定或变性、错误折叠的蛋白质。有研究推测, 这与其多样化且有着精细结构和丰富调节功能的RP有一定关系^[3]。泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin proteasome system, UPS)是真核细胞中与蛋白质质量控制和细

胞稳态维持相关的最主要的ATP依赖性降解系统。这一系统中, 20S CP与19S RP结合形成的26S蛋白酶体可以识别和降解依次经过泛素活化酶(ubiquitin-activating enzyme, E1)、泛素结合酶(ubiquitin-conjugating enzyme, E2)和泛素连接酶(ubiquitin protein ligase, E3)作用而被共价修饰上多聚泛素链标签的蛋白质分子^[4]。26S蛋白酶体的许多底物是与细胞生长密切相关的胞内过程的调节蛋白, 能够调节细胞周期进程、生长信号通路、促凋亡和抗凋亡蛋白质水平等, 其中任何一个过程的异常调节都可能导致细胞恶性转化和肿瘤生成^[5-7]。此外, 由于在抗原处理和递呈等免疫活动中的关键作用, 蛋白酶体功能异常还涉及炎症和自身免疫性疾病的发生^[8]。除此, 已知损伤和异常折叠蛋白质的积累是神经退行性疾病的标志。事实上, 蛋白酶体功能故障与阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿舞蹈病等疾病发

收稿日期: 2016-09-05 接受日期: 2016-12-16

国家自然科学基金(批准号: 31360061)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0931-7972769, E-mail: xbsd-yn@163.com

Received: September 5, 2016 Accepted: December 16, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31360061)

*Corresponding author. Tel: +86-931-7972769, E-mail: xbsd-yn@163.com

网络出版时间: 2017-03-20 16:39:56

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170320.1639.008.html>

生确有直接关系^[9]。随着对UPS途径和26S蛋白酶体理解的不断深入以及对各类RP功能和机制的更多了解,我们对真核细胞蛋白酶体将会有更加清晰的认识。

1 蛋白酶体20S核心颗粒

蛋白酶体表现出的异质性不仅在于CP能够与不同种类RP结合以形成全酶,在CP从头组装过程中,通过亚基替代的方式还会形成几种CP变种。如受 γ -干扰素(interferon-gamma, IFN- γ)诱导,CP的3种催化性亚基 β 1、 β 2和 β 5会分别被水解特异性改变了的 β 1i、 β 2i和 β 5i替代,对应于组成型蛋白酶体核心颗粒(constitutive proteasome core partical, cCP),形成免疫蛋白酶体核心颗粒(immunoproteasomes core particle, iCP)。除此,一种胸腺特异的有着不同水解特异性的 β 5t亚基通过替代iCP中 β 5i形成胸腺蛋白酶体核心颗粒(thymoproteasomes core particle, tCP)。cCP、iCP和tCP表现出有差异的生理功能^[4]。表1总结了cCP、iCP和tCP的主要特性。

1.1 组成型蛋白酶体核心颗粒

cCP是广泛表达于各种真核细胞催化底物肽键水解的蛋白质复合体,由两个外层 α 环和两个内层 β 环堆叠成720 kDa的中空圆桶状结构,每一层环均由七个密切相关亚基组成,可表示为 $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$ 。蛋白酶体活性位点即位于cCP内腔,由 β 亚基Thr1形成独特的基于单个残基的活性位点。酿酒酵母来源CP功能和结构分析表明,七种 β 亚基中仅 β 1、 β 2和 β 5由于Thr1的存在而具有催化活性并分别表现出胱冬肽酶样(caspase-like, C-L)、胰蛋白酶样(trypsin-like,

T-L)和胰凝乳蛋白酶样(chymotrypsin-like, ChT-L)活性,各自倾向于水解底物中酸性、碱性和疏水性残基后肽键。这种水解特异性主要取决于3种 β 亚基S1结合口袋的氨基酸组成和排列^[10-11]。cCP的两个结构要素会限制底物进入其内腔到达活性位点。一个是由外层 α 环各七个 α 亚基N-端残基参与形成的两个闭合的门样结构,另一个是位于 α 环下方直径约53 Å且入口处仅13 Å的称为 α 内环的狭窄通道。因此,cCP是一种天然抑制性酶,只有当底物能够通过门结构和 α 内环进入cCP内腔才会被降解^[12]。实际上,cCP的组装始于两个称为半CP的无活性前体复合物的二聚化,随着 β -前肽加工释放活性位点、分子伴侣Ump1(ub-mediated proteolysis protein 1)降解以及 α 环闭合门样结构形成,cCP得以成熟^[13]。CP组装的这种自区室化偶联了蛋白酶体活性的隔离和激活,同时,通过上述的底物进入限制引入了活性调控的新层面,推测蛋白酶体活性位点与细胞内环境隔离可以避免蛋白质发生不必要的降解。不同物种来源的cCP除了在肽键水解反应机制十分保守外,底物接近活性位点的过程也很相似,即各类RP通过与cCP α 亚基中与门样结构形成相关的保守残基的相互作用来诱导开门构象的形成从而允许底物进入^[14]。也有研究指出,一些肽类和天然无序蛋白质能够被细胞中游离的cCP降解,推测热波动会引发一定频率自发性的开门构象。或者,这些肽类和天然无序蛋白质具有的特定结构要素能够诱导开门构象从而成为自身的RP^[15]。在古细菌和一些真细菌中也发现20S蛋白酶体,其具有与真核CP同样的基本结构但组成简单,一般表达一种 α 亚基和一种 β 亚基^[16-17]。

表1 真核细胞蛋白酶体20S核心颗粒的主要种类及其特性

Table 1 Main types and characteristics of eukaryotic 20S proteasome core particles

核心颗粒	分布和表达	催化性亚基	蛋白酶活性	生理功能
Core partical	Distribution	Catalytic subunits	Protease activity	Physiological functions
cCP	Eukaryotes; Constitutive expressed in kinds of cells	β 1, β 2, β 5	β 1, C-L β 2, T-L β 5, ChT-L	Protein quality control and cell homeostasis sustain
iCP	Vertebrates; Induced expressed in immune cells etc.	β 1i, β 2i, β 5i	β 1i, ChT-L β 2i, T-L β 5i, increased ChT-L	Promoting antigen processing and MHC-I antigen presentation
tCP	Vertebrates; Constitutive expressed in cTECs	β 1i, β 2i, β 5t	β 1i, ChT-L β 2i, T-L β 5t, decreased ChT-L	Promoting CD8 ⁺ T cell positive selection and functional competence formation

cTECs: 胸腺皮质上皮细胞; C-L: 胱冬肽酶样; T-L: 胰蛋白酶样; ChT-L: 胰凝乳蛋白酶样。

cTECs: thymic cortical epithelial cells; C-L: caspase-like; T-L: trypsin-like; ChT-L: chymotrypsin-like.

1.2 免疫蛋白酶体核心颗粒

脊椎动物特异的CP β 亚基 $\beta 1i$ /LMP2、 $\beta 2i$ /MECL1和 $\beta 5i$ /LMP7在造血细胞中有组成型表达, 在免疫细胞等多种细胞中则受IFN- γ 等炎性细胞因子诱导表达并通过不断加入新生CP的组装替代 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\beta 5$ 而形成iCP^[18]。与26S组成型蛋白酶体相比, 26S免疫蛋白酶体能够更加有效地促进抗原处理和I类主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex-I, MHC-I)抗原提呈从而对初期细胞毒性T细胞反应的触发十分重要。已知MHC-I分子倾向于结合疏水性残基, 而26S免疫蛋白酶体由于水解特异性的改变可以更多地生成具有疏水性C-端的肽段^[19-20]。Huber等^[21]对小鼠iCP和cCP晶体结构的研究表明, 尽管 $\beta 5i$ 底物结合凹槽处氨基酸组成和排列的微小变化提示其并未改变的ChT-L活性, 但更为宽敞的S1结合口袋和更为有限且亲水性增强的S3结构口袋是其产生多种携带疏水性残基末端免疫显性MHC-I抗原肽的关键; $\beta 1i$ 底物结合凹槽处疏水氨基酸的排列使其C-L活性大大降低并表现出ChT-L活性从而增强了产生免疫显性MHC-I抗原肽的能力; $\beta 2i$ 与 $\beta 2$ 结构相似, 仅Asp53($\beta 2$)被Glu($\beta 2i$)取代, 并都能够产生带有中性或碱性C-端的MHC-I抗原肽。越来越多的证据提示, iCP具有更为普遍的生理功能。Ebstein等^[22]认为, 26S免疫蛋白酶体在IFN- γ 诱导的氧化应激反应中通过对多聚泛素链修饰的新生氧化损伤蛋白质的有效降解来维持蛋白质稳态从而保护细胞活性。近来的研究表明, iCP涉及T细胞增殖、辅助性T细胞分化和某些多肽类细胞因子的生成以及部分恶性血液病、炎症性疾病、自身免疫疾病等疾病的发生过程^[8,23]。

1.3 胸腺蛋白酶体核心颗粒

脊椎动物能够编码一种胸腺特异的CP β 亚基 $\beta 5t$ 来替代iCP中 $\beta 5i$ 从而形成tCP。与 $\beta 5i$ 存在于多种细胞中不同, $\beta 5t$ 仅发现表达于胸腺皮质上皮细胞(thymic cortical epithelial cells, cTECs), 胸腺蛋白酶体为该组织中最主要的蛋白酶体形式, 而胸腺髓质细胞(thymic medullary cells, mTECs)则表达cCP和iCP两种核心颗粒^[24]。cTECs与mTECs中蛋白酶体种类的不同与胸腺中发生的T细胞阳性选择和阴性选择有关。前者是指能够识别胸腺基质细胞表面自身MHC分子的胸腺细胞才能存活, 后者则指只有不与自身抗原肽反应的T细胞才能存活。在上述的胸腺

选择过程中, 与cTECs表面自身肽-MHC复合体以较低亲和力结合的双阳性细胞能够得以存活并进一步被诱导分化为CD4⁺或CD8⁺单阳性细胞, 识别MHC-I的分化为CD8⁺谱系细胞, 识别MHC-II的则分化为CD4⁺谱系细胞^[4,25]。小鼠中 $\beta 5t$ 敲除对胸腺组织结构 and cTECs表面MHC-I的表达未产生明显影响却导致CD8⁺T细胞的生成下降至25%, 提示 $\beta 5t$ 在CD8⁺T细胞阳性选择中的重要性^[26]。 $\beta 5t$ 与 $\beta 5i$ / $\beta 5$ 在底物结合口袋处有显著不同。 $\beta 5i$ / $\beta 5$ 大部分由疏水氨基酸组成而表现ChT-L活性, $\beta 5t$ 的S1结合口袋处疏水性的降低和底物结合凹槽处亲水侧链的排列则降低了其ChTL活性^[27]。近来有研究表明, 正是tCP这种与iCP不共享的独特水解活性使得tCP表达细胞中MHC-I提呈独特的抗原肽谱, 并且tCP倾向于产生能够有效诱导阳性选择的T细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)配体肽从而贡献于CD8⁺T细胞的阳性选择^[28]。此外, Takada等^[29]指出, 胸腺蛋白酶体的缺失会进一步造成CD8⁺T细胞TCR对抗原的反应性减弱, 即胸腺蛋白酶体依赖的阳性选择对于功能完全CD8⁺T细胞生成的影响不仅在于选择性诱导具低亲和力TCR特异性的胸腺细胞的存活, 还包括阳性选择之后对个体T细胞完全功能形成的积极作用。

2 蛋白酶体调节颗粒

目前已知真核细胞蛋白酶体CP可以与3个不同家族的RP结合, 晶体结构研究已建立了一个各类RP通过其亚基C-端与CP α 环互作的共享模式。最保守也是了解最多的RP家族为19S(也称作PA700), 甲烷球菌蛋白酶体的ATP酶PAN(proteasome activating nucleotidase)和结核分枝杆菌蛋白酶体的ATP酶Mpa(mycobacterial proteasome ATPase)为其同源物, 它们均依赖水解ATP来解折叠底物蛋白并协助其易位于CP内腔。另外两种RP家族分别是11S(包括PA28/REG和PA26)和PA200(Blm10是其酿酒酵母中同源物), 目前认为, 它们可以介导泛素和ATP非依赖的蛋白质降解^[30]。表2总结了19S、11S和PA200/Blm10的主要特性。

2.1 19S/PA700

19S RP, 分子量为700 kDa的蛋白酶体激活因子(proteasome activator MW700, PA700), 在细胞质和细胞核中均有分布, 可以结合至CP一端或两端分别形成26S和30S蛋白酶体, 负责对多聚泛素化底物的

表2 真核细胞蛋白酶体调节颗粒的主要种类及特性

Table 2 Main types and characteristics of eukaryotic 20S proteasome regulate particles

调节颗粒 Regulate particle	分布及表达 Expression	结构特征 Structure	ATP和泛素依赖 ATP & Ub- dependency	活性和生理功能 Activity & functions	
19S (PA700)	Eukaryotes	19 subunits form two major subcomplexes	Yes	Mediate degradation of proteins by UPS; Affect substrate specificity; Improve substrate clearance rate.	
11S	PA28 $\alpha\beta$	Higher eukaryotes	Heteroheptamer	No	Mediate degradation of certain polypeptides and disorder proteins by UIPS; Regulate peptide bond hydrolysis activity of iCP; Reduce the fragment size of iCP degradation outcomes.
	PA28 γ	Higher eukaryotes	Homoheptamer	No	Mediate degradation of certain polypeptides and disorder proteins by UIPS; Regulate peptide bond hydrolysis activity.
	PA26	<i>Trypanosoma brucei</i>	Homoheptamer	No	Activate CP activity of a variety of biological sources.
Blm10/ PA200	Blm10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Monomer	No	Mediate degradation of certain polypeptides and disorder proteins by UIPS; Affect substrate specificity; Regulate peptide bond hydrolysis activity.
	PA200	Mammals	Monomer	No	The same as Blm10.

UPS: 泛素蛋白酶体系统; UIPS: 非泛素依赖的蛋白酶体系统。

UPS: ubiquitin proteasome system; UIPS: ubiquitin-independent proteasome system.

识别、去泛素化、解折叠及递进底物于CP内腔至活性位点从而降解。已知由K48异肽键连接且不少于4个泛素分子的多聚泛素链共价修饰的底物能够有效被其识别^[1,31]。19S被分为底和盖两个亚复合体。酿酒酵母来源19S中,底包括由6个具AAA ATP酶活的亚基(regulatory particle AAA ATPase, Rpt)以Rpt1-Rpt2-Rpt6-Rpt3-Rpt4-Rpt5顺序形成的异源六聚体Rpt环和4种非ATP酶亚基(regulatory particle non-ATPase, Rpn)即Rpn1、Rpn2和作为蛋白酶体常驻泛素受体的Rpn10、Rpn13;盖包括9种非ATP酶亚基即Rpn3、Rpn5-Rpn9、Rpn11、Rpn12和Sem1,其中,蛋白酶体必需去泛素化酶(deubiquitinating enzyme, DUB)Rpn11的活性对底物降解十分关键^[31-32]。由ATP酶亚基N-端残基参与形成的一个位于Rpt环平面之上称作N-环的六元环为底物入口处。ATP酶亚基利用水解ATP释放的能量对底物施加拉力并将其解折叠以促进其通过Rpt酶环狭长通道的同时,通过其C-端与CP α 环特定位点互作诱导 α 环开门构象形成从而进一步促进底物易位CP内腔, HbYX这一ATP酶亚基C-端保守模体在两者互作中十分关键^[33-34]。Lander等^[35]在亚纳米水平上揭示了酿酒酵母19S及其与CP结合形成26S全酶后各亚基的空间排布,进一步勾勒出底物降解通路并为阐明有效降解对泛素

链长度、泛素连接方式的依赖提供了拓扑学信息。该研究发现,19S盖绑定在全酶一侧并同时与19S底和CP接触,全酶形成后盖构象的重新排列提示这种互作介导了对Rpn11的变构激活,同时亚复合体间的接触和互作在协同调节底物处理的每一步中都起到重要作用。近期,对19S亚复合体中Rpn11-Rpn8异二聚体高分辨结构的鉴定可以推测,与Rpn8的接触可以帮助Rpn11定位于蛋白酶体中央通道之上从而利于移除底物泛素链后促进其易位^[36]。此外,26S识别泛素化底物的主要泛素受体Rpn10和Rpn13在哺乳动物体内这一过程中的具体行为机制和功能差异还有待明确。Hamazaki等^[37]通过对Rpn10和Rpn13缺陷小鼠的分析表明,Rpn13在26S泛素识别中是作为Rpn10的功能冗余角色且为细胞稳态维持所必需,同时推测,Rpn13的这种辅助调节功能主要发生在蛋白质毒性压力、细胞增殖(尤其是肿瘤细胞)等特定条件下的蛋白酶体底物降解过程。

2.2 11S/PA28/PA26

3种分子量约28 kDa的同源蛋白质PA28 α 、PA28 β 和PA28 γ (也称作REG α 、REG β 和REG γ)作为PA28的亚基表达于高等真核生物^[38]。有着50%序列同源性的蛋白质PA28 α 和PA28 β ,多以 $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha\beta$ 的顺序形成一个环状七聚体PA28 $\alpha\beta$,分布于细胞中。PA28 γ 主要以

环状同源七聚体形式分布在细胞核内,与CP结合后可以激活T-L活性而抑制C-L和ChTL活性^[39]。另外,一个表达于布氏锥虫且构成亚基与PA28亚基有明显序列差异的环状同源七聚体被发现可以激活多种生物来源CP的活性,称为PA26^[40]。PA28 $\alpha\beta$ 、PA28 γ 和PA26都属于11S RP。对PA26分别与酿酒酵母和嗜酸热原体来源CP形成的蛋白酶体晶体结构研究揭示了11S的诱导开门机制。PA26伸展的螺旋束亚基聚集形成一个中空七聚环形式的花托状结构,与CP α 环结合的C-端和对激活CP水解活性十分关键的内部激活环在PA26花托状结构的宽口一端七重对称存在。通过结合CP门结构处所有 α 亚基的口袋结构并相等程度地移动其Pro17回折,PA26诱导开门构象形成^[41]。Ruschak等^[42]利用液体核磁共振表明,嗜酸热原体来源CP在溶液中存在多种构象而非高分辨率晶体结构分析提示的单一构象。这些异构体在PA28 $\alpha\beta$ 的结合位点至活性位点间的连续结构区域内是不同的,而PA28 $\alpha\beta$ 的结合或CP中涉及与PA28 $\alpha\beta$ 互作的保守残基的突变均能够引起不同构象间分布发生转换并导致底物水解模式的改变;同时,CP活性位点的修饰以相同机制传递至RP结合位点并诱导开门构象的形成和RP-CP复合体稳定性的增加。

目前对11S生理功能了解不多。PA28的中央通道或许可以容纳某些多肽和天然无序蛋白质的扩散,而PA26亚基螺旋向中央通道突出形成隔板状结构被认为阻碍底物的进入^[1]。关于PA28,一种推测是,19S-CP-PA28杂合蛋白酶体中PA28将19S-20S复合体定位于一定细胞环境中^[38]。也有研究发现,PA28 γ 以一种泛素和ATP非依赖的方式在类固醇受体共激活因子-3、丙型肝炎病毒核心蛋白、泛素连接酶Smurf1等几种天然无序蛋白质的降解中发挥作用,但也表明其降解还同时涉及UPS途径^[43-45]。Sun等^[46]研究表明,巨噬细胞中PA28 γ 以泛素和ATP非依赖的方式通过对NF- κ B转录抑制因子KLF2的降解调节NF- κ B途径而在细菌性病原体的宿主防御中起重要作用。KLF2稳定性是否同时受到UPS途径影响还未知。与 β 5i一样,PA28 α 和PA28 β 在多种细胞中会受干扰素诱导表达,提示PA28 $\alpha\beta$ 与MHC-I抗原肽产生有关,但PA28 $\alpha\beta$ 缺失小鼠中抗原处理及免疫反应几乎未受影响的现象未能支持这一观点^[47]。Raule等^[48-49]通过体外降解实验对iCP、19S-iCP和PA28 $\alpha\beta$ -

iCP不同形式免疫蛋白酶体的生化特性和降解产物谱进行了分析。结果表明,PA28 $\alpha\beta$ 与PA28 γ 一样可以介导天然无序蛋白质以泛素和ATP非依赖的方式降解,而PA28 $\alpha\beta$ 与iCP的结合未能如19S的结合一样大大增加底物蛋白质的清除速率,而是整体上降低了降解肽段的大小并更加倾向产生半胱天冬酶样切割的、亲水性更强的肽段。推测PA28 $\alpha\beta$ 作为一种选择性筛网控制降解产物从iCP内腔中的释放,或通过变构调节途径修饰了iCP活性位点。

2.3 Blm10/PA200

表达于酿酒酵母的Blm10与其人类细胞同源物PA200,是由32个HEAT重复单位组成的约245 kDa的单体蛋白质,主要以杂合蛋白酶体Blm10/PA200-20S-19S形式分布于细胞核中,能够激活蛋白酶体C-L和T-L活性^[50-51]。Blm10-CP-Blm10晶体结构研究揭示,Blm10以HEAT重复样螺旋管结构折叠为1.5圈的超螺旋,形成一个仅提供18 Å×9 Å大小开口的拱顶样结构围绕在CP入口处^[52]。

与19S Rpt环亚基和11S七聚体环亚基一样,Blm10通过其C-端结合20S并诱导和稳定开门构象,且类似于19S Rpt环亚基C-端HbYX,Blm10 C-端一个保守模体YYX/YFX在两者互作中十分关键。不同的是,19S六聚体Rpt环和七聚体11S能够同时移动CP α 环多个 α 亚基从而介导门结构打开,单体Blm10则通过移动单一 α 亚基使门结构紊乱而非完全打开^[53]。另有研究指出,Blm10保守的C-端构象与核输入受体karyopherin/importin β 型超螺旋化Ran蛋白结合域相似,两者存在一定结构相关性^[54]。

Blm10/PA200的生理功能还有待明确。对Blm10-蛋白酶体特异性降解的底物认识不多。Sfp1是酿酒酵母中调节核糖体蛋白基因转录的激活因子之一,分子内部含有丰富的无序结构区域。研究发现,Blm10缺失或其C-端突变都会导致Sfp1稳定性增加且MG132的加入不能延长Sfp1半寿期,提示Sfp1特异受Blm10-蛋白酶体降解^[55]。随后有报道称,tau-441这个天然无序蛋白质可以被Blm10-蛋白酶体体外降解^[56]。Tar等^[57]的研究表明,线粒体功能受Blm10-蛋白酶体介导的线粒体分裂蛋白Dnm1降解的影响且结构预测Dnm1分子内部有一个约150个氨基酸大小的未折叠区域。此外,已知PA200在哺乳动物所有组织中都有表达,睾丸中高表达^[50]。Khor等^[58]发现,小鼠PA200敲除后精子发生过程缺陷并导

致雄鼠生育能力降低。考虑到线粒体对精子细胞高能量需求表现出的适应性如大量融合过程和Blm10对线粒体功能的影响,推测睾丸中高水平PA200造成Drp1(Dnm1在人类细胞的同源物)大量降解从而下调线粒体分裂。除此,已知精子发生过程中组蛋白会暂时被转换蛋白(transition protein, TP)替代并最终替换为精蛋白^[59]。Qian等^[60]发现,哺乳动物睾丸中一种含有精细胞特异 α 亚基a4s/PSMA8及/或免疫蛋白酶体催化性 β 亚基的PA200-蛋白酶体在该过程中介导乙酰化依赖的组蛋白降解,同时表明,降解也发生在DNA修复和DNA转录过程中。综上推测,降解某些多肽类及天然无序蛋白质代表了Blm10/PA200-蛋白酶体在体内的关键作用。另一方面,从Blm10封闭的结构和诱导CP门结构紊乱而非完全打开的活性推测,其作为蛋白酶体接头分子、组装因子或非直接激活因子更合乎逻辑。Weberruss等^[61]和Burcoglu等^[62]的研究均指出,当静止期的酵母细胞重新开始增殖时,Blm10促进了被隔离于细胞质蛋白酶体储存颗粒(proteasome storage granuli, PSG)中成熟CP的核输入。其介导与核孔蛋白Nup53的互动并由于Gsp1-GTP(Ran-GTP在酵母中的同源物)的结合而释放CP, PSG则很快消失且蛋白酶体重新定位于核中。考虑到Blm10与karyopherin/importin β 的结构相关性,推测Ran-GTP的结合诱导Blm10发生构象变化并使其关键性酪氨酸与CP的互动减弱,进而释放CP于细胞核中。

3 结语与展望

真核细胞蛋白酶体复杂的组织结构突出了对这种蛋白质水解机器的复杂需求,其必须能容纳和特异调节众多底物,活性的发挥也将作用于多种细胞活动,涉及多种生理功能。而在这些生理功能完成过程中,CP的肽键水解活性和底物特异性也会受到相应调节。如本文中所述,目前已很好建立了各类RP通过与CP结合,促进底物选择并诱导CP开门协助底物接近活性位点的共享机制,但不能排除的是,RP的结合可以通过变构调节途径诱导CP活性位点改变从而影响底物的降解。这一推测已得到一些生化分析和结构研究数据的支持。此外,关于11S和Blm10/PA200在杂合蛋白酶体中与19S有哪些功能上的相互作用及对蛋白酶体活性有哪些确切影响,尽管已经提出了补偿性功能、增加底物特异性、帮助蛋白酶体在胞内的区域定位等,但至今未能完全了解。随着对各类RP与蛋白酶体相关的生理功能的更多发现,将进一步帮助我们了解两者在活性及生理功能之间的联系,从而对真核细胞蛋白酶体有更加深入和清晰的认识。目前,对真核蛋白酶体在疾病治疗中的作用机制及相关靶点药物的研发展开了广泛研究。图1示意了UPS途径和26S蛋白酶体抑制剂药物研究现状。26S蛋白酶体抑制剂不仅能够诱导某些类型癌细胞的凋亡,在需要器官移植患者或自身免疫性疾病患者的治疗中也表现出积极作用^[63]。CP靶向的蛋白酶体抑制剂如硼酸肽类硼

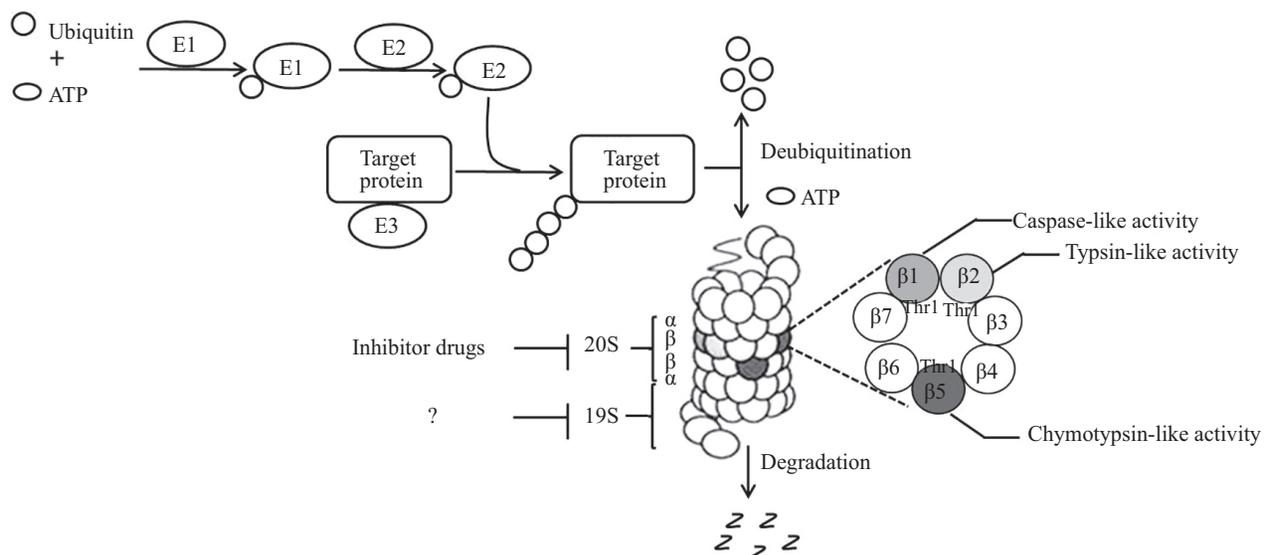


图1 UPS途径和26S蛋白酶体抑制剂药物(根据文献[65]修改)

Fig. 1 Ubiquitin-proteasome pathway and 26S proteasome inhibitor drugs (modified from reference [65])

替佐米(Bortezomib/Velcade[®])、环氧酮肽类卡非佐米(Carfilzomib/Kyprolis[®])和同为硼酸肽类的埃沙佐米(Ixazomib/Ninlaro[®]), 已先后作为美国食品及药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准药物应用于多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)等恶性血液疾病的治疗; 同时, 硼酸肽类Delanzomib、环氧酮肽类Oprozomib和天然化合物 β -内酯类Marizomib由于良好的口服生物利用度和改善的作用效力处于临床实验阶段^[64-65]。此外, 19S靶向抑制剂由于能够部分克服临床上传统CP靶向分子不断出现的耐药性从而代表了一种新兴抗癌药物。近期关于26S中19S亚复合体结构研究的进展也将促进该类靶向抑制剂的研发^[66]。

参考文献 (References)

- Glickman MH, Rubin DM, Fried VA, Finley D. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* 1998; 18(6): 3149-62.
- Smith DM, Chang SC, Park S, Finley D, Cheng Y, Goldberg AL. Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Mol Cell* 2007; 27(5): 731-44.
- Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 477-513.
- Ciechanover A. Intracellular protein degradation: From a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Bioorg Med Chem* 2013; 21(12): 3400-10.
- Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: On protein death and cell life. *EMBO J* 1998; 17(24): 7151-60.
- Ciechanover A, Schwartz AL. The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(6): 2727-30.
- Hershko A. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death Differ* 2005; 12(9): 1191-7.
- Kimura H, Caturegli P, Takahashi M, Suzuki K. New insights into the function of the immunoproteasome in immune and nonimmune cells. *J Immunol Res* 2015; 2015: 541984.
- Paul S. Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in multiple disease conditions: Therapeutic approaches. *Bioessays* 2008; 30(11/12): 1172-84.
- Brannigan JA, Dodson G, Duggleby HJ, Moody PC, Smith JL, Tomchick DR, *et al.* A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* 1995; 378(6555): 416-9.
- Seemuller E, Lupas A, Stock D, Lowe J, Huber R, Baumeister W. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: A threonine protease. *Science* 1995; 268(5210): 579-82.
- Groll M, Bajorek M, Köhler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, *et al.* A gated channel into the proteasome core particle. *Nature Struct Biol* 2000; 7(11): 1062-7.
- Ramos PC, Dohmen RJ. PACemakers of proteasome core particle assembly. *Structure* 2008; 16(9): 1296-304.
- Stadtmueller BM, Hill CP. Proteasome activators. *Mol Cell* 2011; 41(1): 8-19.
- Baugh JM, Viktorova EG, Pilipenko EV. Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *J Mol Biol* 2009; 386(3): 814-27.
- Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, *et al.* Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 1997; 386(6624): 463-71.
- Kwon YD, Nagy I, Adams PD, Baumeister W, Jap BK. Crystal structures of the *Rhodococcus* proteasome with and without its propeptides: Implications for the role of the pro-peptide in proteasome assembly. *J Mol Biol* 2004; 335(1): 233-45.
- Kloetzel PM. Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(3): 179-87.
- Wang J, Maldonado MA. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol* 2006; 3(4): 255-61.
- Kincaid EZ, Che JW, York I, Escobar H, Reyes-Vargas E, Delgado JC, *et al.* Mice completely lacking immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. *Nat Immunol* 2012; 13(2): 129-35.
- Huber EM, Basler M, Schwab R, Heinemeyer W, Kiek CJ, Groettrup M, *et al.* Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity. *Cell* 2012; 148(4): 727-38.
- Ebstein F, Voigt A, Lange N, Warnatsch A, Schröter F, Prozorovski T, *et al.* Immunoproteasomes are important for proteostasis in immune responses. *Cell* 2013; 152(5): 935-7.
- Basler M, Kirk CJ, Groettrup M. The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Curr Opin Immunol* 2013; 25(1): 74-80.
- Murata S, Sasaki K, Kishimoto T, Niwa S, Hayashi H, Takahama Y, *et al.* Regulation of CD8⁺ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* 2007; 316 (5829): 1349-53.
- Nitta T, Murata S, Sasaki K, Fujii H, Ripen AM, Ishimaru N, *et al.* Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8⁺ T cells. *Immunity* 2010; 32(1): 29-40.
- van Ender P. Providing ligands for MHC class I molecules. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68(9): 1467-9.
- Xing Y, Jameson SC, Hogquist KA. Thymoproteasome subunit- β 5T generates peptide-MHC complexes specialized for positive selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(17): 6979-84.
- Sasaki K, Takada K, Ohte Y, Kondo H, Sorimachi H, Tanaka K, *et al.* Thymoproteasomes produce unique peptide motifs for positive selection of CD8⁺ T cells. *Nat Commun* 2015; 6: 7484.
- Takada K, Van Laethem F, Xing Y, Akane K, Suzuki H, Murata S, *et al.* TCR affinity for thymoproteasome-dependent positively selecting peptides conditions antigen responsiveness in CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* 2015; 16(10): 1069-76.
- Tanaka K, Mizushima T, Saeki Y. The proteasome: Molecular machinery and pathophysiological roles. *Biol Chem* 2012; 393(4): 217-34.
- Smith DM, Chang SC, Park S, Finley D, Cheng Y, Goldberg AL. Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's a ring opens the gate for substrate entry. *Mol Cell*

- 2007; 27(5): 731-44.
- 32 Gomez TA, Kolawa N, Gee M, Sweredoski MJ, Deshaies RJ. Identification of a functional docking site in the Rpn1 LRRdomain for the UBA-UBL domain protein Ddi1. *BMC Biol* 2011; 9: 33.
 - 33 Tomko RJ Jr, Funakoshi M, Schneider K, Wang J, Hochstrasser M. Heterohexameric ring arrangement of the eukaryotic proteasomal ATPases: Implications for proteasome structure and assembly. *Mol Cell* 2010; 38(3): 393-403.
 - 34 Smith DM, Fraga H, Reis C, Kafri G, Goldberg AL. ATP binds to proteasomal ATPases in pairs with distinct functional effects, implying an ordered reaction cycle. *Cell* 2011; 144(4): 526-38.
 - 35 Lander GC, Estrin E, Matyskiela ME, Bashore C, Nogales E, Martin A. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* 2012; 482(7384): 186-91.
 - 36 Worden EJ, Padovani C, Martin A. Structure of the Rpn11-Rpn8 dimer reveals mechanisms of substrate deubiquitination during proteasomal degradation. *Nat Struct Mol Biol* 2014; 21(3): 220-7.
 - 37 Hamazaki J, Hirayama S, Murata S. Redundant roles of Rpn10 and Rpn13 in recognition of ubiquitinated proteins and cellular homeostasis. *PLoS Genet* 2015; 11(7): e1005401.
 - 38 Rechsteiner M, Hill CP. Mobilizing the proteolytic machine: Cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol* 2005; 15(1): 27-33.
 - 39 Sugiyama M, Sahashi H, Kurimoto E, Takata S, Yagi H, Kanai K, *et al.* Spatial arrangement and functional role of subunits of proteasome activator PA28 in hetero-oligomeric form. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 432(1): 141-5.
 - 40 Whitby FG, Masters EI, Kramer L, Knowlton JR, Yao Y, Wang CC, *et al.* Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* 2000; 408(6808): 115-20.
 - 41 Förster A, Masters EI, Whitby FG, Robinson H, Hill CP. The 1.9 Å structure of a proteasome-11S activator complex and implications for proteasome-PAN/PA700 interactions. *Mol Cell* 2005; 18(5): 589-99.
 - 42 Ruschak AM, Kay LE. Proteasome allostery as a population shift between interchanging conformers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(50): E3454-62.
 - 43 Li X, Lonard DM, Jung SY, Malovannaya A, Feng Q, Qin J, *et al.* The SRC-3/AIB1 Coactivator is degraded in a ubiquitin- and ATP-independent manner by the REGγ proteasome. *Cell* 2006; 124(2): 381-92.
 - 44 Suzuki R, Moriishi K, Fukuda K, Shirakura M, Ishii K, Shoji I, *et al.* Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: A ubiquitin-dependent mechanism and a ubiquitin-independent but PA28-gamma-dependent mechanism. *J Virol* 2009; 83(5): 2389-92.
 - 45 Nie J, Wu M, Wang J, Xing G, He F, Zhang L. REGgamma proteasome mediates degradation of the ubiquitin ligase Smurf1. *FEBS Lett* 2010; 584(14): 3021-7.
 - 46 Sun J, Luan Y, Xiang D, Tan X, Chen H, Deng Q, *et al.* The 11S proteasome subunit PSME3 is a positive feedforward regulator of NF-κB and important for host defense against bacterial pathogens. *Cell Rep* 2016; 14(4): 737-49.
 - 47 Fabre B, Lambour T, Delobel J, Amalric F, Monsarrat B, Bulet-Schiltz O. Subcellular distribution and dynamics of active proteasome complexes unraveled by a workflow combining *in vivo* complex cross-linking and quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2013; 12(3): 687-99.
 - 48 Raule M, Cerruti F, Benaroudj N, Migotti R, Kikuchi J, Bachi A, *et al.* PA28αβ reduces size and increases hydrophilicity of 20S immunoproteasome peptide products. *Chem Biol* 2014; 21(4): 470-80.
 - 49 Raule M, Cerruti F, Cascio P. Enhanced rate of degradation of basic proteins by 26S immunoproteasomes. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843(9): 1942-7.
 - 50 Ustrell V, Hoffman L, Pratt G, Rechsteiner M. PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *EMBO J* 2002; 21(13): 3516-25.
 - 51 Schmidt M, Haas W, Crosas B, Santamaria PG, Gygi SP, Walz T, *et al.* The HEAT repeat protein Blm10 regulates the yeast proteasome by capping the core particle. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12(4): 294-303.
 - 52 Blickwedehl J, Agarwal M, Seong C, Pandita RK, Melendy T, Sung P, *et al.* Role for proteasome activator PA200 and postglutamyl proteasome activity in genomic stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(42): 16165-70.
 - 53 Sadre-Bazzaz K, Whitby FG, Robinson H, Formosa T, Hill CP. Structure of a Blm10 complex reveals common mechanisms for proteasome binding and gate opening. *Mol Cell* 2010; 37(5): 728-35.
 - 54 Huber EM, Groll M. The 19S cap puzzle: A new jigsaw piece. *Structure* 2012; 20(3): 387-8.
 - 55 Lopez AD, Tar K, Krügel U, Dange T, Ros IG, Schmidt M. Proteasomal degradation of Sfp1 contributes to the repression of ribosome biogenesis during starvation and is mediated by the proteasome activator Blm10. *Mol Biol Cell* 2011; 22(5): 528-40.
 - 56 Dange T, Smith D, Noy T, Rommel PC, Jurzitza L, Cordero RJ, *et al.* Blm10 protein promotes proteasomal substrate turnover by an active gating mechanism. *J Biol Chem* 2011; 286(50): 42830-9.
 - 57 Tar K, Dange T, Yang C, Yao Y, Bulteau AL, Salcedo EF, *et al.* Proteasomes associated with the Blm10 activator protein antagonize mitochondrial fission through degradation of the fission protein Dnm1. *J Biol Chem* 2014; 289(17): 12145-56.
 - 58 Khor B, Bredemeyer A, Huang CY, Turnbull IR, Evans R, Maggi LB Jr, *et al.* Proteasome activator PA200 is required for normal spermatogenesis. *Mol Cell Biol* 2006; 26(8): 2999-3007.
 - 59 Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 2009; 460(7254): 473-8.
 - 60 Qian MX, Pang Y, Liu CH, Haratake K, Du BY, Ji DY, *et al.* Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis. *Cell* 2013; 153(5): 1012-24.
 - 61 Weberruss MH, Savulescu AF, Jando J, Bissinger T, Harel A, Glickman MH, *et al.* Blm10 facilitates nuclear import of proteasome core particles. *EMBO J* 2013; 32(20): 2697-707.
 - 62 Burcoglu J, Zhao L, Enenkel C. Nuclear import of yeast proteasomes. *Cells* 2015; 4(3): 387-405.
 - 63 Verbrugge SE, Scheper RJ, Lems WF, de Gruijl TD, Jansen G. Proteasome inhibitors as experimental therapeutics of autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther* 2015; 17: 17.
 - 64 Teicher BA, Tomaszewski JE. Proteasome inhibitors. *Biochem Pharmacol* 2015; 96(1): 1-9.
 - 65 Carmony K, Lee W, Kim KB. High-resolution snapshots of proteasome inhibitors in action revise inhibition paradigms and inspire next-generation inhibitor design. *Chembiochem* 2016; 17(22): 2115-7.
 - 66 Śledź P, Baumeister W. Structure-driven developments of 26S proteasome inhibitors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2016; 56: 191-209.