

内质网压力响应相关的蛋白质降解*

闫孟节^{1,2)} 侯运华¹⁾ 吕珊珊^{1,2)} 钟耀华^{2)**}

(¹⁾ 齐鲁工业大学生物工程学院, 济南 250353; (²⁾ 山东大学生命科学院微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

摘要 内质网相关蛋白质降解途径(ERAD), 即蛋白质分泌过程中错误折叠或未折叠的蛋白质在内质网中被识别并逆向运输到细胞质经聚泛素化后由蛋白酶体降解的过程。自从发现该途径后对其机制的阐明一直处于不断探索的阶段。近年来, 对 ERAD 底物识别、逆向运输和泛素化新组分的发现以及新技术的应用, 使得该途径的具体分子机制更加清晰。本文全面梳理并综述了内质网应激响应、ERAD 降解过程与机理的最新进展, 并对模式蛋白底物和最新研究方法进行了总结, 以期展示该领域的研究概况。

关键词 内质网, 分泌压力, 错误折叠蛋白质, ERAD, Hrd1

学科分类号 Q256

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0350

真核细胞中, 内质网是分泌蛋白质合成和成熟的重要场所, 富含协助蛋白质折叠和修饰的各种分子伴侣、折叠酶等。由于转录翻译失败、基因突变或不同条件压力(强还原剂或热激条件)等原因, 蛋白质会发生错误折叠并聚集在内质网中, 引起内质网压力, 从而影响细胞正常功能, 甚至会引起严重疾病^[1]。常见疾病如糖尿病和神经变性疾病如帕金森症、亨廷顿症等均与错误折叠蛋白质在内质网聚集密切相关。例如囊性纤维化跨膜传导因子(CFTR)在内质网聚集会导致囊性纤维化疾病^[2]。Gedalya 等^[3](2015 年)研究发现, 早老素 1(presenilin 1) P264 位点突变导致该蛋白在内质网不能正确折叠从而成为诱导阿尔茨海默症的关键因素。真核细胞内调控内质网压力的途径主要有两种, 即非折叠蛋白响应(UPR)和内质网相关降解途径(ERAD)。前者借助细胞内的一系列信号转导反应, 上调分子伴侣和折叠酶的表达量来提高蛋白质的折叠能力; 后者则通过逆转运方式将最终不能正确折叠的蛋白底物运出内质网进一步由细胞质的泛素蛋白酶体系统降解。内质网中蛋白质折叠与降解的动态平衡不仅对于细胞存活起着非常关键的作用, 而且是许多疾病研究的重要靶点。另外, ERAD 途径在酵母至哺乳动物中是保守的, 这说明它是真核细胞的基本生物

学过程^[4]。近年来, ERAD 途径中新组分的不断发现和相关分子机制的逐步阐明, 使得该途径成为细胞生物学研究中备受关注的领域。本文主要以真核模式生物酿酒酵母为例重点阐述内质网 ERAD 途径中的底物识别、定位、逆运输及蛋白酶体降解机理, 同时也总结了 ERAD 研究的模式底物及研究方法等进展。

1 内质网应激响应

内质网是分泌型蛋白质合成、转运和加工的“中央处理器”, 如质膜受体、离子通道、分泌型激素和胞外酶等均在内质网中折叠成熟, 然后运送至细胞相关部位发挥各自功能。分泌型蛋白质的新生多肽链依赖 N 端信号肽定位到内质网膜蛋白 Sec61 通道上转运入内质网, 再经信号肽酶的剪切、低聚糖转移酶的糖基化修饰、分子伴侣及折叠酶等促进折叠的共同作用, 最终形成成熟的蛋白质。同时,

* 国家自然科学基金(31370135), 山东大学基本科研业务费专项资金(2015CJ005)和山东省农业科技成果转化资金(2014-45)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0531-88366118, E-mail: zhongyaozhua@sdu.edu.cn

收稿日期: 2015-11-02, 接受日期: 2016-03-29

细胞具有严格的蛋白质质量控制系统, 只有经过正确折叠和修饰达到天然构象的蛋白质才能运出内质

网并经囊泡运输到高尔基体, 最后送达目标细胞器或分泌到细胞外^[5].

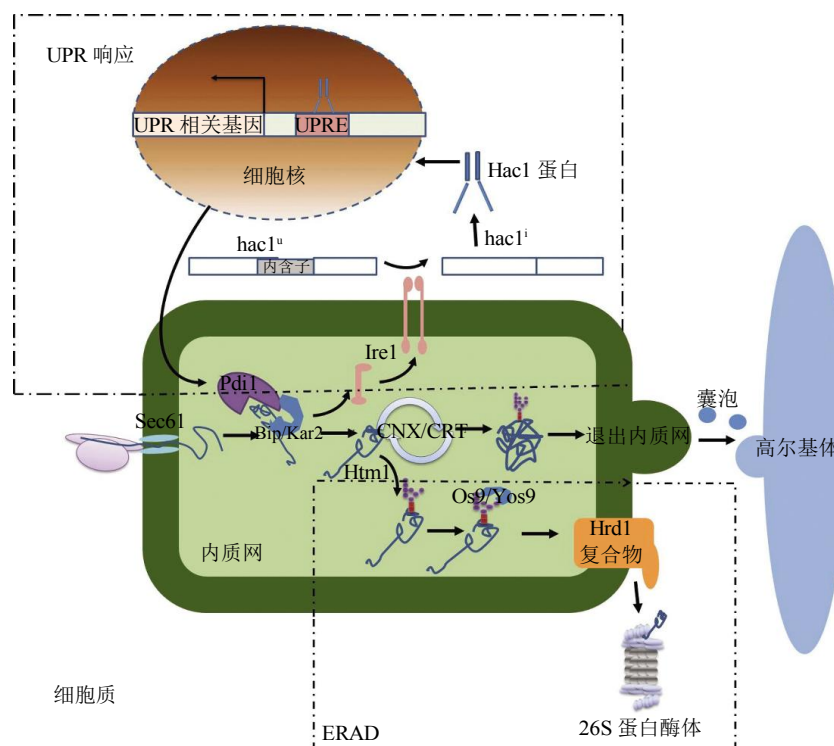


Fig. 1 Overview of the ER stress responses in eukaryotes

图1 真核细胞内质网压力响应示意图

如图1所示, 新合成的多肽链进入内质网后进行折叠和修饰形成具有生物学功能的蛋白质. 在这一过程中分子伴侣 Bip/Kar2 通过与未折叠蛋白质的疏水区结合, 防止蛋白质间相互聚集同时又协助蛋白质折叠. 当内质网内存在大量未折叠蛋白质时, 更多的 Bip/Kar2 从内质网压力感受器——跨膜蛋白 Ire1 上解离下来, 使游离的 Ire1 增加, 于是 Ire1 形成二聚体, 导致自身磷酸化而活化^[5]. 活化后的 Ire1 二聚体能特异地剪切位于细胞质中的 *hac1* mRNA(*hac1^u*)内含子, 该内含子在不同真核生物中大小从 20~300nt 不等^[6]. 随后, 剪切后的 *hac1* mRNA(*hac1ⁱ*)由 tRNA 连接酶连接后翻译成具有活性的 b-ZIP 型转录因子 Hac1, 然后该因子定位至细胞核并结合到染色体 DNA 上的 UPRE 区进而上调 UPR 相关基因表达. 这些基因主要编码内质网分子伴侣和折叠酶类, 如 Bip/Kar2、二硫键异构酶 Pdi1 和凝集素类蛋白 CNX/CRT 等. 在哺乳动物中, UPR 响应还包括 PERK 途径和 ATF6 途径^[7]. 若蛋白质持续不能正确折叠将进入 ERAD 途

径最终运出内质网被蛋白酶体降解. 另外, Hac1 还可降低蛋白质的合成量、扩展内质网膜结构及上调 ERAD 以调节内质网压力^[8], 这也说明 UPR 与 ERAD 途径共同调节分泌途径中的折叠和降解能力的平衡.

尽管很多分子伴侣和折叠酶致力于蛋白质折叠, 仍有许多新合成的多肽链进入内质网后无法形成正确的构象. 不同蛋白质错误折叠程度不同、起因各异, 如突变、化学毒物、蛋白结构复杂或分子伴侣紧缺等均能引起内质网压力^[9]. 另外, 我们通过检测低等真核生物里氏木霉(*Trichoderma reesei*)本源蛋白分泌过程中内质网压力响应发现, 分泌初期会引起显著的 UPR 响应, 但随后 UPR 响应降低, 该现象以前也有报道^[9], 说明自身蛋白的合成分泌也会引起内质网压力, 因此, 该机制的深入探索有助于加深内质网功能的了解.

2 ERAD 降解机理

内质网中蛋白质的折叠由严格的质量控制系统

监控,一旦蛋白质出现错误折叠,便会被特定组分识别并逆向运输到细胞质中,经泛素化后被蛋白酶体降解,这一途径即为 ERAD 途径^[10]. ERAD 存在于所有的真核细胞中,且近 1/3 的蛋白质都进入分泌途径并在内质网腔成熟,故 ERAD 途径的研究对于认识蛋白质合成分泌及细胞功能尤为重要^[5,11]. 如图 1 所示,持续不能正确折叠的蛋白质被甘露糖苷酶 Htm1 识别修饰,进一步由 Yos9 识别并定位

至内质网膜蛋白 Hrd1 复合物上,随后逆向运输到细胞质中被 26S 蛋白酶体降解. 大量分子参与到 ERAD 途径中发挥不同作用,它们在进化上相对保守,广泛存在于酵母到哺乳动物中,目前许多组分已经被鉴定(表 1). 根据 ERAD 途径的功能,其基本过程主要分为底物识别、定位、泛素化、逆向运输和蛋白酶体降解等步骤.

Table 1 Conserved components required for ERAD
表 1 ERAD 途径相关保守元件

分类	酵母	哺乳动物	功能
识别	Yos9	OS9, XTP3-B	底物识别
	Kar2	BiP	分子伴侣, 底物识别
	Hrd3	SEL1	底物识别, 稳定 Hrd1
	Der1	Derlin-1, Derlin-2, Derlin-3	底物识别, 将底物转移给 Hrd1
泛素化	Usp1	HERP	Hrd1 和 Der1 低聚化
	Hrd1	HRD1, gp78	E3 泛素连接酶
	Doa10	TEB4	E3 泛素连接酶
	Ubc6	Ubc6, Ubc6e	E2 泛素结合酶
	Ubc7	UBE2G1, UBE2G2	E2 泛素结合酶
逆向运输	Ubx2	UBXD8	Cdc48 招募因子
	Cdc48	p97/VCP	底物的逆运输和膜抽离
	Npl4	NPL4	Cdc48 辅助因子
	Ufd1	UFD1	Cdc48 辅助因子
降解	Rad23	HR23a/b	泛素结合蛋白
	Png1	PNG1	去糖基酶
	Rpn11	POH1	去泛素化酶
	Ubp6	USP14	去泛素化酶

2.1 底物识别

ERAD 途径的首要步骤是底物识别过程,且底物的降解程度取决于底物的识别水平,因此这一过程受严格的控制. 若错误折叠蛋白质不能完全检测到,则会引起错误折叠蛋白质聚集,最终影响细胞正常生理功能;相反,如果 ERAD 过于活跃,则会大量降解折叠中间产物或正确折叠蛋白质进而严重影响细胞的生长存活,如溶酶体水解酶在内质网合成过程中过度降解会引起溶酶体相关疾病,如高雪氏病等^[12-13]. 故 ERAD 底物的识别对于保持蛋白质成熟和降解的平衡尤为重要.

蛋白质折叠的中间产物和最终错误折叠的蛋白质在结构上存在一定的相似性——本应包埋蛋白质内部的疏水区暴露在外面. 暴露疏水区的蛋白质

之间发生聚集而引起折叠失败. 为了防止蛋白质分子的聚集,分子伴侣如 70 ku 的热休克蛋白 Hsp70 家族(Bip/Kar2)与疏水区结合,促进多肽链折叠. Hsp70 家族分子是 ATP 依赖型的分子伴侣,其结构包括 N 端的核苷酸结合结构域(NBD)和 C 端的多肽链底物结合结构域(SBD). 在 Hsp40 或 DnaJ 辅助下 Hsp70 由 ATP 状态转变成 ADP 状态,从而对蛋白质底物具有强亲和性. 最近研究显示,核转换因子 NEFs 可将 Hsp70 再转换为 ATP 状态,使其与底物亲和性降低,从而从底物上释放出来^[14]. 当底物与 Hsp70 相互作用时间过长,就被招募到 ERAD 途径中的 E3 泛素连接酶 Hrd1 复合物上被识别^[15]. 因此, Hsp70 在 ERAD 底物识别和筛选中具有重要作用.

分泌途径中约有 70% 蛋白质需 N-糖基修饰才能达到最终构象, 同时, 多肽链的糖基化状态也是检测其折叠情况和导向 ERAD 的信号(图 2). 初始多肽链进入内质网剪去信号肽序列后, 低聚糖转移酶 OST 便将糖链 $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Glc 为葡萄糖, Man 为甘露糖, GlcNAc 为 N-乙酰葡萄糖胺) 转移到多肽链 Asn-X-Ser/Thr 基序的天冬氨酸残基上(X 代表除脯氨酸外的任意氨基酸). 随后被葡萄糖苷酶 Gs I (GH63 家族) 和 Gs II (GH31 家族) 移去 A 分支(图 2 中糖链最左侧分支)上的 2 个葡萄糖分子^[16], 使糖链变为单葡萄糖形式的 $\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}_2$. 该糖链能被凝集素类分子伴侣——钙联蛋白(CNX)和钙网蛋白(CRT)识别, 从而促进糖蛋白进一步折叠. Gs II 可将糖链进一步移去第三个葡萄糖分子使其变为 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 形式. 此时, 多肽链若折叠正确, 则从 CNX/CRT 上脱离并运出内质网继续分泌, 多肽链若发生错误折叠或未折叠成熟, 就被 UDP-糖蛋白葡萄糖基转移酶 UGGT 重新加上 1 分子葡萄糖形成糖链 $\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}_2$, 然后再次被 CNX/CRT 识别促进折叠, 这个过程即为钙联蛋白

/ 钙网蛋白(CNX/CRT)循环^[17]. 多肽链如果折叠时间过长或最终不能正确折叠, 便会被 α -甘露糖苷酶 Mns1 除去糖链 B 分支上的最后一个甘露糖, 使得糖链变为 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, 这是蛋白质退出折叠循环的信号. 带有该糖链的多肽链会被甘露糖苷酶复合物 Htm1 识别, 进一步除去 C 分支上的最后一个甘露糖形成末端为 α -1, 6-甘露糖残基的 $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ 糖链形式, 这是触发 ERAD 降解的信号^[18](图 2). 通过这种“糖链时钟”机制, 错误折叠的多肽链便进入 ERAD 途径. 随后, 多肽链被凝集素类蛋白 Yos9 的腔结构域识别. Yos9 属于 Hrd1 泛素连接酶复合物的一部分. 酵母中的 Yos9 有一个 N 端 6-磷酸甘露糖同源结构域(MRH)和 C 端低聚化结构域, 其中 MRH 能识别 $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ 糖链. 最近发现, 高等真核生物 Os9 的 C 端结构域还包括一个特异的“哺乳动物特异插入点”(mammalian-specific insets), 该区域能与另一分子伴侣 Grp94 结合参与 ERAD^[19]. 对糖链识别机制的研究将有助于深入理解蛋白质底物如何进入 ERAD 途径.

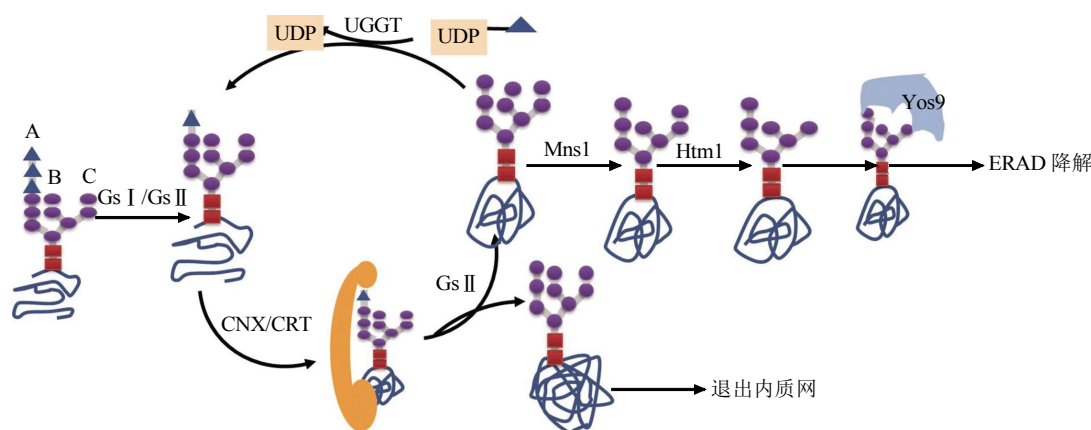


Fig. 2 The recognition mechanism of misfolded N-linked glycoproteins in the ER

图 2 内质网内错误折叠的 N-糖基蛋白质识别机制

▲: 葡萄糖; ●: 甘露糖.

蛋白质的糖链信号是引发 ERAD 的关键因素, 然而, 对于单独的糖链信号能否充分引起 ERAD 响应, 目前仍处于探索阶段, 因为糖链外的位置也可能是重要因素. 我们利用带有不同糖基化和无糖基化的蛋白质来研究内质网压力响应下的分泌情况, 发现糖链有无都可一定程度上引起 ERAD, 但是无糖基化蛋白在不能正确折叠时如何被识别目前还不能确定. 我们也尝试将 Os9 基因敲除来探索

底物的识别机制, 发现缺失 OS9 后, 糖基化蛋白在强分泌压力下也会发生胞内降解, 因此是否存在有别于凝集素类的底物识别因子在 ERAD 信号识别上起到重要作用, 还需要深入研究.

2.2 ERAD 定位

错误折叠的蛋白底物进入 ERAD 途径后便定位到泛素连接酶复合物上. 内质网主要的 E3 泛素连接酶有 Hrd1 和 Doa10 两大类, 然而也可能存在

其他泛素连接酶参与 ERAD. Stolz 等^[20]最近在酵母中鉴定了一种新型的泛素连接酶 Ubr1, 能够在 Hrd1 和 Doa10 缺失条件下将 50% 的交配信息素转运子突变体 Ste6* 和 70% 的囊性纤维化跨膜传导调节子 CFTR 降解, 这也进一步证明内质网中存在多种底物降解机理. ERAD 途径可以根据蛋白质发生错误折叠的部位分为 3 类, 即 ERAD-L(错误折叠的蛋白质区域位于内质网腔中)、ERAD-M(位于内质网膜中)和 ERAD-C(位于内质网膜的细胞质面)^[21]

(图 3). ERAD-L 途径中, 底物由内质网腔内的 Hsp70 家族 Yos9、Hrd3 或 Bip 腔结构域识别, 随后结合底物的 Yos9 与 Hrd3 将底物靶向定位到 Hrd1 泛素连接酶复合物上. 而 ERAD-M 途径中, 底物可直接被 Hrd1 的跨膜结构域识别, 再到达 Hrd1 和 Hrd3、Usa1、Der1 三者中的一个组分组成的复合物上. ERAD-C 中的泛素连接酶是 Doa10, 因此在细胞质面发生错误折叠的膜蛋白底物被靶向定位到 Doa10 上^[22].

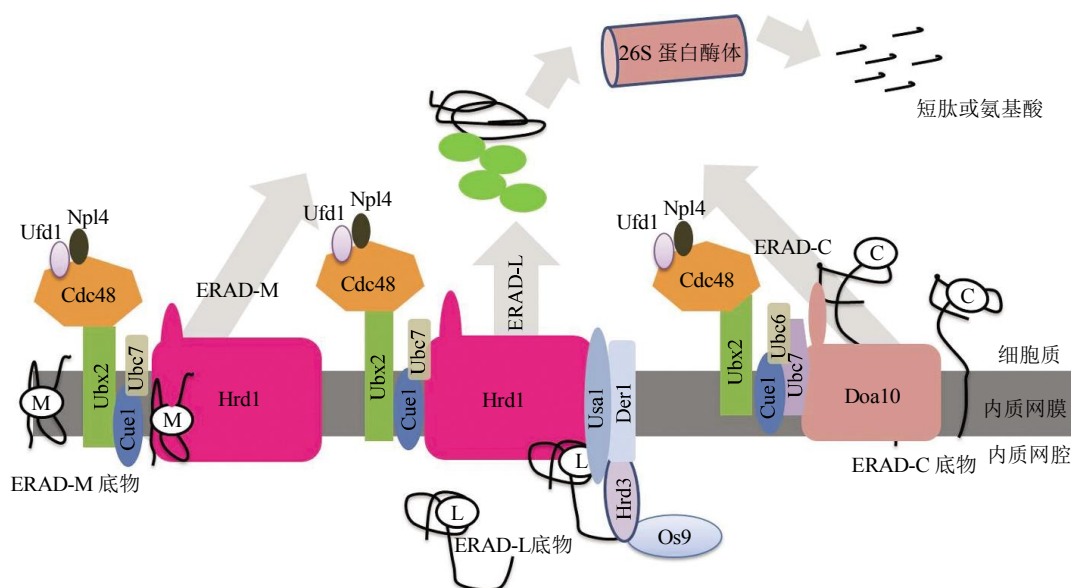


Fig. 3 Distinct endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathways

图 3 不同内质网相关降解(ERAD)途径

2.3 底物泛素化

E3 泛素连接酶 Hrd1 或 Doa10 与 E2 泛素结合酶 Ubc7 共同作用将底物泛素化. 泛素是由 76 个氨基酸组成的短肽, 能够通过异肽键结合到底物赖氨酸残基的 ϵ 氨基上. 泛素本身含有的赖氨酸残基 (K6、K11、K27、K29、K33、K48 和 K63) 可通过与另一泛素分子的 K48 交联形成聚泛素化链. 4 个以上泛素分子组成的聚泛素链形成蛋白酶体的降解信号, 且聚泛素化链的长度能够影响底物与蛋白酶体的相互作用, 调节底物的降解程度^[23]. 参与泛素化的酶类主要有 3 种: E1 泛素激活酶 (Uba1)、E2 泛素结合酶 (Ubc6/Ubc7)、E3 泛素连接酶 (Hrd1/Doa10)(图 4). 泛素分子首先被 E1 激活, 即 E1 水解 ATP 将泛素分子腺苷化, 然后与 E1 活性中心的半胱氨酸残基间形成一个高能硫酯键, 接着通过硫酯键的形式将泛素转移至 E2 的保守半胱氨酸

上, 随后, E3 催化泛素分子从 E2 转移到蛋白底物上. E2 上的 E3 结合位点与 E1 结合位点几乎重叠, 因此 E2 需从 E3 上解离下来后才能继续装载泛素, 经过数轮的转移反应即可形成聚泛素化链. 其中, E3 主要由 RING 指、U-box 和 HECT 3 个结构域组成, RING 指和 U-box 负责将泛素分子添加到底物上, 而 HECT 通过与泛素形成硫酯键使其自身泛素化. 最终聚泛素化的底物被蛋白酶体降解, 聚泛素化链被去泛素化酶降解成游离的泛素分子, 进入下一轮的底物泛素化过程, 实现了泛素的循环利用^[24].

2 种 E3 泛素连接酶 Hrd1 或 Doa10 都包括 RING 指结构域, 但在 E2 泛素结合酶的选择上存在不同. Doa10 与泛素结合酶 Ubc6 和 Ubc7 共同相互作用催化底物的聚泛素化, 而 Hrd1 只与 Ubc7 结合. Ubc6 的尾部锚定在内质网膜上, 而 Ubc7 是

中参与底物的定位和传递. Der1 具有 4 个跨膜结构域, 锚定在内质网膜上起到传递作用. Usa1 穿梭在内质网膜上, 其 C 端结构域结合 Der1, N 端结合 Hrd1, 发挥桥梁作用将底物传递给 Hrd1. 底物传递到 Hrd1 后便被泛素化^[26]. 同时 Usa1 细胞质面的 2 个跨膜片段能够促进 Hrd1 的低聚化. 有研究表明, Usa1 的 H 片段敲除后使得 Hrd1 无法低聚化, 从而导致底物 CPY* 无法降解^[27]. 低聚化的 Hrd1 形成跨膜通道, 对于底物的逆向运输十分重要^[28]. Cdc48 是保守的六聚体 AAA-ATP 酶, 可为底物的逆向运输提供动力, 但其本身游离在细胞质中, 需在 Ufd1-Npl4 辅因子二聚体及内质网整合膜蛋白 Ubx2 的协助下招募至内质网膜. 其中, Cdc48 的 N 端结构域与 Ubx2 的 UBX 结构域相结合使其定位在内质网膜上. 同时 Cdc48 与泛素化的底物结合, 并在 ATP 水解提供的能量下像一个分子棘齿一样将底物从内质网膜上抽出^[29]. Cdc48 大量存在于细胞质和细胞核中, 除了在 ERAD 中发挥重要作用, 还调节其他细胞功能, 如参与细胞周期控制、细胞分化、膜融合和 DNA 修复等^[30].

2.5 蛋白酶体降解

26S 蛋白酶体是细胞质中约 2.5Mu 的大分子机器, 由 2 个 19S 调节微粒(RP)的帽子结构和 1 个 20S 水解催化中心(CP)的圆筒结构组成(图 6). RP 包括圆环状底座(base)和盖(lid)结构, 底座的功能是消除蛋白底物折叠痕迹并将其运送到 CP 中, 而盖结构的功能是在底物降解前将聚泛素链切除^[31]. 底座结构包括 3 个非 ATP 酶亚基(Rpn1、Rpn2 和

Rpn13)和 6 个不同的 AAA⁺ ATP 酶亚基(Rpt1 ~ Rpt6), 后者组成的异六聚体 ATP 环能够随着 ATP 水解引起构象改变为底物的传递提供推力. 而盖结构固定在底座上, 含有去泛素化酶 Rpn11. 当底物不存在时, 底座结构的异六聚体 ATP 环呈陡峭的螺旋状态以利于结合底物; 而当结合底物后, 异六聚体 ATP 环则改变构象呈较平坦的螺旋状态以利于底物传送到催化中心, 同时 Rpn11 被转移到中心孔的上方去除底物的泛素分子. 最近发现, 除了 Rpn11 外还存在另一种去泛素化酶——Ubp6, 属于 60 ku 的泛素特异性蛋白酶(USP), 能够结合在 Rpn1 亚基上切割底物与泛素链之间的异肽键. 有趣的是, Ubp6 与泛素结合能够抑制 Rpn11 的去泛素酶活性、稳定蛋白酶体的底物传递状态及阻止后续底物的进入^[32]. CP 结构是由 4 排圆环组成的一个空心圆筒, 外层 2 排由 α 亚基组成($\alpha 1 \sim \alpha 7$), 内层 2 排由 β 亚基组成($\beta 1 \sim \beta 7$). CP 含有多种水解酶类, 如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和谷氨酰胺类水解酶等, 主要功能是将蛋白质底物降解为小分子^[33].

聚泛素化的底物被 Cdc48 复合物抽出内质网膜后与受体蛋白 Rad23 或 Dsk2 的 UBA 模块结合. 随后运输至 26S 蛋白酶体 RP 上, 经过清除糖链、泛素链及折叠痕迹后转移至 CP 结构降解(图 6). Rad23 和 Dsk2 结合底物后分别停靠在蛋白酶体 Rpn1 亚基的不同位点, 而 Rad23 还能与 Png1 相结合. Png1 能切割糖蛋白骨架上天冬氨酸残基与 N-乙酰谷氨酰胺之间的异肽键, 将底物上的糖链释放, 从而有利于底物进入蛋白酶体通道的催化位

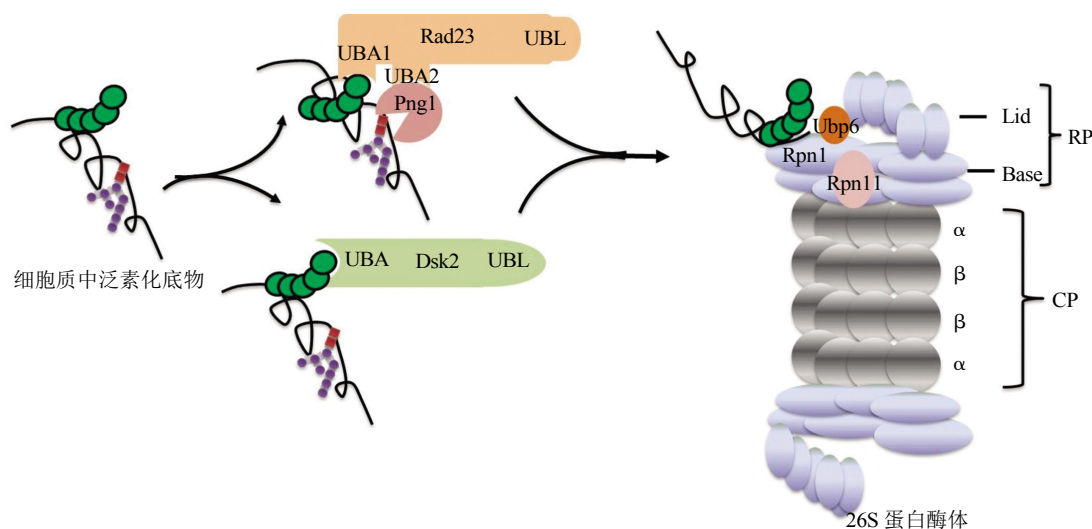


Fig. 6 The degradation mechanism of substrates by 26S proteasome

图 6 26S 蛋白酶体降解机制

点^[34]. Rad23 具有 2 个 C 端 UBA 模块 (UBA1/UBA2) 和 1 个 N 端 UBL 模块, 2 个 UBA 模块都能够结合底物的聚泛素链, 且 UBA2 模块能与 Png1 结合, 而 UBL 模块能够与蛋白酶体 Rpn1 亚基和 Ufd2 结合从而将底物导向 RP 结构上的 Rpn10 和 Rpn13 亚基^[35]. 同时, 去泛素化酶 Ubp6 可长时间结合在 Rpn1 亚基上, 负责将底物的泛素链除去. 蛋白酶体与底物结合的调节受多种因素影响, 如最近发现, Rad23 UBL 模块的丝氨酸残基 (S47/S73) 磷酸化可阻止底物与蛋白酶体结合, 而 Rad23 在细胞质中发生去磷酸化后, 可恢复原始状态, 但其具体磷酸化调节机制仍未探明^[36]; 单泛素化的 Rpn10 亚基能够降低 Rpn10- 蛋白酶体及 Rpn10-Dsk2 的联系, 从而将蛋白酶体的 “高 Rpn10/ 低 Dsk2” 状态转变为 “低 Rpn10/ 高 Dsk2” 状态来调节蛋白酶体与底物的接受效率^[37]. 虽然蛋白酶体各亚基和多种受体蛋白的基本功能已经比较清晰, 但是各成分之间的相互调节机制目前仍所知甚少.

3 模式蛋白底物

不同底物折叠难易程度不同, 引起 ERAD 的程度也不同^[38], 故底物的选择对研究 ERAD 途径十分重要. 例如, 利用黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 表达 5 种不同异源蛋白 (白介素 IL-6、组织相容酶原激活剂 tPA、锰过氧化物酶 MnP1、葡萄糖淀粉酶 GlgA 和漆酶 Laccase) 时, 发现它们引起的 *derA* 和 *hrdC* 表达程度差异很大, 且表达 tPA 和 Laccase 时引起的 ERAD 反应最为强烈^[39].

目前, 羧肽酶 Y 的突变体 CPY* (第 255 位的甘氨酸突变为精氨酸) 是研究 ERAD 最常用的模式蛋白, 属于 ERAD-L 类底物. 它具有 4 个糖基化位点, 在内质网中易发生错误折叠而被降解. Benitez 等^[40]利用 CPY* 为底物研究 ERAD 途径, 发现 Yos9 既可识别错误折叠的糖蛋白也可识别非糖基化蛋白质. 人类囊性纤维化跨膜传导调节因子 CFTR 也是研究 ERAD 的模式蛋白, 属于 ERAD-M 类底物. 该蛋白质折叠速率十分缓慢, 正常条件下只有 25% 能折叠成功并运出内质网, 而其余部分则进入 ERAD 途径被降解, 尤其在酵母中异源表达时几乎 100% 被降解^[41]. ERAD-M 类底物的另一模式蛋白是羟甲基 CoA 还原酶 Hmg2. 它是脂质生物合成中的关键酶, 在脂质动态平衡中受到反馈抑制, 当甾醇或其衍生物大量存

在时被迅速降解^[42]. 而酵母性表型转录抑制因子 MAT α 2 属于 ERAD-C 类底物, 其 N 端的 67 个氨基酸残基易与降解决定子 Degron 结合从而被蛋白酶体降解^[43]. 这些模式底物都属于易在不同部位发生错误折叠的蛋白质, 故研究不同类型的 ERAD 需选用不同类型的底物, 下表总结了不同类型 ERAD 途径研究的常用底物 (表 2).

Table 2 ERAD substrate

表 2 ERAD 模式底物

分类	底物	注释
ERAD-L	CPY*	羧肽酶 Y 突变体
	α 1-Antitrypsin	丝氨酸蛋白酶抑制剂
ERAD-M	CFTR	囊性纤维化跨膜传导调节因子
	Hmg2	羟甲基 -CoA 还原酶
	Pdr5*	ATP 结合盒转运蛋白突变体
ERAD-C	MAT α 2	性表型转录抑制因子
	Ste6*	交配信息素转运子突变体

另外, 我们利用纤维素降解真菌自身分泌的主要水解酶 CBH1 和外源蛋白漆酶 LacA 作为模式蛋白来研究 ERAD 途径时, 发现 CBH1 在分泌前期会引起显著 UPR 响应和一定程度的 ERAD 响应, 且该蛋白发生了部分降解, 而 LacA 可持续引起 UPR 和 ERAD 响应, 大部分发生了胞内降解 (结果待发表). 这也说明在研究同一类型蛋白质分泌压力响应时, 采用不同的蛋白底物会有助于 ERAD 机制的深入了解. 尤其是, 我们使用的 CBH1 是折叠完好且具有生物学功能的蛋白质也有可能靶向定位到 ERAD 途径中, 其降解原因和具体降解机制目前还不清楚, 这一现象尽管在其他蛋白如 Hmg2 的分泌过程中也存在.

4 最新研究方法

检测 ERAD 途径成员间相互作用的传统方法有免疫共沉淀、化学交联和密度梯度离心等, 这些方法为研究 ERAD 机制奠定了良好基础. 而新型细胞与分子生物学工具的开发, 为深入研究 ERAD 途径提供了强有力的帮助. 例如, 体外重构方法能精确反应底物识别、泛素化和逆向运输的分子机制; 活体细胞成像技术和光交联定点技术可进一步阐明体内 ERAD 的特定步骤. 这些新技术的应用将为系统展示 ERAD 功能和内质网动态平衡提供

便利。

4.1 体外重构

体外重构是通过表达和纯化各途径组分来体外模拟细胞内分子相互作用关系的技术。它能够精确反应各分子间的作用, 但不足的是只能对已鉴定的组分进行分析。如 Stein 等^[44]利用酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 表达的纯化组分重构了 ERAD-L 途径的关键步骤, 这包括模式底物 CPY* 和逆向运输的关键组分 Hrd1、Ubc7、Cue1 和 Cdc48 复合物等。然后, 通过免疫共沉淀及荧光标签技术模拟 CPY* 与 Hrd1 相互作用、Hrd1 泛素化、Cdc48 复合物与底物作用等过程。发现 Hrd1 利用疏水性的跨膜结构域片段结合未折叠的多肽, 且低聚化的 Hrd1 更有利于结合底物。而 Cdc48 复合物成功将底物从膜上抽出, 且去泛素化酶 Otu1 将底物聚泛素链去除, 然后 Cdc48p 复合物从底物上脱离。

4.2 活体细胞成像技术

尽管体外重构能利用一系列纯化组分和化学脂质膜重复 ERAD 的主要步骤, 但却无法展现 ERAD 各步骤间及与其他途径间的相互关系。而活体细胞成像技术能利用遗传手段拓展这一局限。例如, 绿色荧光蛋白(GFP)常被作为分子标签来研究靶蛋白在细胞内的动态走向。Cabantous 等^[45]利用 GFP 成像特点, 在细胞质中表达 GFP 蛋白 N 端区, 而在内质网中表达与底物融合的 GFP 蛋白 C 端区, 一旦底物逆运输到细胞质中, GFP 蛋白的 N 端与 C 端结合便会发出荧光信号, 这样直接证实了底物的逆运输过程。Kautto 等^[46]在里氏木霉中表达带有 GFP 标签的 CBH1 突变体, 分析了其在细胞内的定位及其降解过程, 这为研究丝状真菌分泌蛋白过程中 ERAD 响应提供了有效的策略。利用此技术时, 需考虑底物是否具有可溶性, 以及 GFP 由于折叠速率缓慢或未预期的翻译后修饰而导致被蛋白酶体降解。尽管如此, 活体细胞成像技术已成为研究 ERAD 途径的重要工具。

4.3 体内位点特异性光交联

位点特异性光交联技术(site-specific crosslinking)是利用琥珀密码子 UAG 和琥珀抑制 tRNA 系统进行蛋白质标记的方法。在该技术中, 琥珀抑制 tRNA 能够识别 DNA 上的琥珀密码子 UAG, 从而在翻译过程中将光敏性物质插入肽链中。例如, 在酵母中表达 CPY* 的同时也一并表达琥珀抑制 tRNA 和相应的氨酰 tRNA 合成酶, 由于 CPY* 基因中包含数个琥珀密码子, 这样氨酰 tRNA 合成酶

会将带有光敏性二苯甲酮(BPA)的琥珀抑制 tRNA 特异结合琥珀密码子, 从而将 BPA 插入肽链的特定位置, 在紫外线照射下, BPA 结合的 CPY* 与相邻蛋白交联发出荧光, 从而实时监测底物的降解过程。Carvalho 等^[28]利用此技术发现底物是由 Hrd3 传递给 Hrd1, 且 Hrd3、Usa1 和 Der1 都能调节 Hrd1 功能。Mehnert 等^[47]利用此技术发现, 内质网腔内底物与 Yos9 和 Hrd3 结合后传递给 Der1, 然后通过 Der1 的膜区域与 Hrd1 相互作用, 进一步将底物定位到 Hrd1 复合物。

5 展 望

生命过程中的细胞不可避免会暴露在各种环境下, 如热激、氧化压力、辐射及其他毒性物质等, 引起蛋白质无法折叠及非特异性聚集从而导致内质网压力。细胞自身的 UPR 响应可以感知内质网压力引发分子伴侣表达升高促进蛋白质折叠, 而 ERAD 将错误折叠的蛋白质靶向到蛋白酶体降解, 这两大途径是细胞应对环境压力、调节内质网折叠能力、维持内质网动态平衡的关键质量控制系统。近年来, 随着组分重构、活体成像及定点光交联等新技术的发展和应用, ERAD 机制的研究取得了很大进步, 尽管如此还有很多疑问待探明。例如, 由于参与 ERAD 过程的很多组分的结构信息并不完善, 导致分子间的具体相互作用细节模糊。此外, ERAD 如何保持自身蛋白不被降解、错误折叠的无糖基化蛋白如何被识别、病毒如何利用 ERAD 途径避免免疫反应以及 ERAD 与细胞其他功能的联系等, 这些都是该领域未来研究的难点。另外, 越来越多的证据也表明, 错误折叠蛋白质在内质网中的聚集与多数致命性疾病的病源及发病机理相关, 如 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症、1 型糖尿病、囊肿性纤维化等^[2-4]。这些疾病相关问题的解释不仅能加深对细胞生物学的了解而且能够为治疗相关重大疾病提供更明确的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Ruggiano A, Foresti O, Carvalho P. ER-associated degradation: Protein quality control and beyond. *The Journal of Cell Biology*, 2014, **204**(6): 869-879
- [2] Pranke I M, Gaudelus I S. Biosynthesis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2014, **52**(7): 26-38
- [3] Gedalya B T, Moll L, Sagie M B, et al. Alzheimer's disease-causing proline substitutions lead to presenilin 1 aggregation and malfunction. *The EMBO*, 2015, **34**(22): 2820-2839

- [4] Araki K, Nagata K. Protein folding and quality control in the ER. Cold Spring Harbor Perspectives Biology, 2012, **4**(8): a015438
- [5] van Anken E, Braakman I. Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2005, **40**(4): 191–228
- [6] Montero A, Goity A, Larrondo L F. The bZIP transcription factor HAC1-1 is involved in the unfolded protein response and is necessary for growth on cellulose in *Neurospora crassa*. Plos One, 2015, **10**(7): e0131415
- [7] Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2012, **13**(2): 89–102
- [8] Schroder M, Kaufman R J. ER stress and the unfolded protein response. Mutation Research, 2005, **569**(1–2): 29–63
- [9] Wang G K, Zhang D Y, Chen S L. Effect of earlier unfolded protein response and efficient protein disposal system on cellulase production in *Rut C30*. World J Microbiol Biotechnol, 2014, **30**(10): 2587–2595
- [10] Smith S H, Ploegh H L, Weissman J S. Road to ruin: Targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. Science, 2011, **334**(6059): 1086–1090
- [11] 钟耀华, 王晓利, 汪天虹. 丝状真菌高效表达异源蛋白研究进展. 生物工程学报, 2008, **24**(4): 531–540
Zhong Y H, Wang X L, Wang T H. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, **24**(4): 531–540
- [12] Hruska K S, LaMarca M E, Scott C R, *et al.* Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). Hum Mutat, 2008, **29**(5): 567–583
- [13] Tan Y L, Genereux J C, Pankow S, *et al.* ERdj3 is an endoplasmic reticulum degradation factor for mutant glucocerebrosidase variants linked to gaucher's disease. Chemistry Biology, 2014, **21** (8): 967–976
- [14] Mayer M P, Kityk R. Insights into the molecular mechanism of allostery in Hsp70s. Frontiers in Molecular Biosciences, 2015, **2**(20): 58
- [15] Izawa T, Nagai H, Endo T, *et al.* Yos9p and Hrd1p mediate ER retention of misfolded proteins for ER-associated degradation. Molecular Biology of the Cell, 2012, **23**(7): 1283–1293
- [16] Alessio C D, Dahms N M. Glucosidase II and MRH-domain containing proteins in the secretory pathway. Current Protein and Peptide Science, 2015, **16**(1): 31–48
- [17] Caramelo J J, Castro O A, Alonso L G, *et al.* UDP-Glc: glycoprotein glucosyltransferase recognizes structured and solvent accessible hydrophobic patches in molten globule-like folding intermediates. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, **100**(1): 86–91
- [18] Ninagawa S, Okada T, Sumitomo Y, *et al.* EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step. J Cell Biol, 2014, **206**(3): 347–356
- [19] Seidler P M, Shinsky S A, Hong F, *et al.* Characterization of the Grp94/OS-9 chaperone-lectin complex. J Molecular Biology, 2014, **426**(21): 3590–3605
- [20] Stolz A, Besser S, Hottmann H, *et al.* Previously unknown role for the ubiquitin ligase Ubr1 in endoplasmic reticulum-associated protein degradation. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, **110** (38): 15271–15276
- [21] Carvalho P, Goder V, Rapoport T A. Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathway for the degradation of ER proteins. Cell, 2006, **126**(2): 361–373
- [22] Hirsch C, Gauss R, Horn S C, *et al.* The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. Nature, 2009, **458**(7237): 453–460
- [23] Lemus L, Goder V. Regulation of endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD) by Ubiquitin. Cells, 2014, **3** (3): 824–847
- [24] Finley D, Ulrich H D, Sommer T, *et al.* The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2012, **192**(2): 319–360
- [25] Metzger M B, Liang Y H, Das R, *et al.* A structurally unique E2-binding domain activates ubiquitination by the ERAD E2, Ubc7p, through multiple mechanisms. Molecular Cell, 2013, **50**(4): 516–527
- [26] Horn S C, Hanna J, Hirsch C, *et al.* Usa1 functions as a scaffold of the HRD-ubiquitin ligase. Molecular Cell, 2009, **36**(5): 782–793
- [27] Carroll S M, Hampton R Y. Usa1p is required for optimal function and regulation of the Hrd1p endoplasmic reticulum-associated degradation ubiquitin ligase. The Journal of Biological Chemistry, 2010, **285**(8): 5146–5156
- [28] Carvalho P, Stanley A M, Rapoport T A. Retro-translocation of a misfolded luminal ER protein by the ubiquitin-ligase Hrd1p. Cell, 2010, **143**(4): 579–591
- [29] Schubert C, Buchberger A. Membrane-bound Ubx2 recruits Cdc48 to ubiquitin ligases and their substrates to ensure efficient ER-associated protein degradation. Nature Cell Biology, 2005, **7**(10): 999–1006
- [30] Dargemont C, Nazari B O. Cdc48/p97, a key actor in the interplay between autophagy and ubiquitin/proteasome catabolic pathways. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, **1823**(1): 138–144
- [31] Marques A J, Palanimurugan R, Matias A C, *et al.* Catalytic mechanism and assembly of the proteasome. Chemical Reviews, 2009, **109**(4): 1509–1536
- [32] Bashore C, Dambacher C M, Goodall E A, *et al.* Ubp6 deubiquitinase controls conformational dynamics and substrate degradation of the 26S proteasome. Nature Structural & Molecular Biology, 2015, **22**(9): 712–719
- [33] Groll M, Ditzel L, Lowe J, *et al.* Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. Nature, 1997, **386**(6624): 463–471
- [34] Suzuki T, Park H, Kwofie M, *et al.* Rad23 provides a link between the Png1 deglycosylating enzyme and the 26S proteasome in yeast. The Journal of Biological Chemistry, 2001, **276**(24): 21601–21607
- [35] Husnjak K, Elsasser S, Zhang N X, *et al.* Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. Nature, 2008, **453**(7194): 481–488
- [36] Liang R Y, Chen L, Ko B T, *et al.* Rad23 Interaction with the proteasome is regulated by phosphorylation of its ubiquitin-like (Ubl) domain. Journal of Molecular Biology, 2014, **426** (24): 4049–4060

- [37] Zuin A, Bichmann A, Isasa M, *et al.* Rpn10 monoubiquitination orchestrates the association of the ubiquitin-type DSK2 Receptor with the proteasome. *Biochemical Journal*, 2015, **472**(3): 353–65
- [38] Taxis C, Hitt R, Park S H, *et al.* Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**(38): 35903–35913
- [39] Neuza D S, Carvalho P, Arentshorst M, *et al.* Effects of a defective ERAD pathway on growth and heterologous protein production in *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, **89**(2): 357–373
- [40] Benitez M E, Stolz A, Wolf D H. Yos9, a control protein for misfolded glycosylated and non-glycosylated proteins in ERAD. *FEBS Letters*, 2011, **585**(19): 3015–3019
- [41] Kiser G L, Gentzsch M, Kloser A K, *et al.* Expression and Degradation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2001, **390**(2): 195–205
- [42] Song B L, Sever N, Russell A, *et al.* Gp78, a membrane-anchored ubiquitin ligase, associates with insig-1 and couples sterol-regulated ubiquitination to degradation of HMG CoA reductase. *Molecular Cell*, 2005, **19**(6): 829–840
- [43] Rubenstein E M, Kreft S J, Greenblatt W, *et al.* Aberrant substrate engagement of the ER translocon triggers degradation by the Hrd1 ubiquitin ligase. *Journal of Cell Biology*, 2012, **197**(6): 761–773
- [44] Stein A, Ruggiano A, Carvalho P, *et al.* Key steps in ERAD of luminal ER proteins reconstituted with purified components. *Cell*, 2014, **158**(6): 1375–1388
- [45] Cabantous S, Terwilliger T C, Waldo G S. Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**(1): 102–107
- [46] Kautto L, Grinyer J, Paulsen I, *et al.* Stress effects caused by the expression of a mutant cellobiohydrolase I and proteasome inhibition in *Trichoderma reesei* Rut-C30. *New Biotechnology*, 2013, **30**(2): 183–191
- [47] Mehnert M, Sommer T, Jarosch E. Der1 promotes movement of misfolded proteins through the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, 2013, **16**(1): 77–86

Protein Degradation Related to Endoplasmic Reticulum Stress*

YAN Meng-Jie^{1,2)}, HOU Yun-Hua¹⁾, LÜ Shan-Shan^{1,2)}, ZHONG Yao-Hua^{2)**}

⁽¹⁾ Bioengineering Institute, Qilu University of Technology, Jinan 250353, China;

⁽²⁾ State Key Laboratory of Microbial Technology, School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract Endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD) is a mechanism, which recognizes misfolded and unfolded proteins of the ER and retrotranslocates them into the cytoplasm for degradation by the ubiquitin-proteasome machinery. Since it was discovered, many researches have conducted to contribute to understanding the mechanism of this conserved pathway. Recently, with the significant progresses in identification of new components revolved in substrate recognition, retrotranslocation and ubiquitylation, as well as the development of new techniques in this area, the specific molecular mechanism of ERAD becomes more clear. The recent progress in the ER stress response and the roles of the components related to ERAD process are summarized with focuses on their molecular mechanisms to provide an overview of this field. Also, the model ERAD substrates and the novel strategies recently developed are included.

Key words ER, secretion stress, misfolded protein, ERAD, Hrd1

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0350

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31370135), Fundamental Research Funds of Shandong University (2015CJ005) and Shandong Research Funds for Transfer of Agricultural Technological Achievements (2014-45).

**Corresponding author.

Tel: 86-531-88366118, E-mail: zhongyao-hua@sdu.edu.cn

Received: November 2, 2015 Accepted: March 29, 2016