

· 成果简介 ·

# 泛素蛋白及其多聚体动态结构和功能的研究

刘主<sup>1,2</sup> 龚洲<sup>1</sup> 唐淳<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院武汉物理与数学研究所, 波谱与原子分子物理国家重点实验室, 中国科学院生物磁共振分析重点实验室, 武汉 430071; 2. 浙江大学基础医学院基础药理学系, 杭州 310058)

[关键词] 泛素; 动态结构; 核磁共振; 构象选择

DOI:10.16262/j.cnki.1000-8217.2015.06.016

泛素蛋白(Ub; ubiquitin)是真核细胞中高度保守又极其重要的一类信号蛋白,它通过与下游靶蛋白的相互作用调控多种细胞信号通路。与Ub相互作用的靶蛋白非常多、在细胞内分布极其广泛<sup>[1,2]</sup>,几乎参与了所有的生命活动过程<sup>[3]</sup>。多个Ub之间可以以异肽键共价连接,形成二聚或多聚Ub。Ub之间可以有8种不同的连接方式,以不同方式连接的多聚Ub调控不同的信号通路,参与不同的生命过程。其中,K48和K63位连接的Ub多聚体研究得最多,通常认为是“经典”的多聚形式<sup>[1]</sup>。前者参与蛋白质的降解过程,而后者主要与DNA的损伤修复以及先天性细胞免疫相关<sup>[2,4]</sup>。晶体学的研究表明,K48-泛素多聚体的亚基相互靠近,呈闭合态<sup>[5-7]</sup>,而K63-泛素多聚体的亚基相互远离,呈打开态<sup>[3,8,9]</sup>。因此,较早的观点认为这种结构上的差异使得它们行使不同的功能。

事实上,结构和功能的关系没有这么简单。在体内环境的溶液条件下,蛋白质在行使功能的时候其结构通常是动态变化的,蛋白质在生理条件下可同时存在多种构象,构象之间的相互转化使得蛋白质能够识别不同的靶蛋白、行使不同的功能<sup>[10]</sup>。关于多聚Ub的结构与功能的关系也需要从动态结构的角度来考量。近年来,我们联合顺磁核磁共振(PRE-NMR)与多种生物物理方法,建立并完善了一套适用于蛋白质动态结构和功能研究的理论和方法(<http://www.tanglab.org>),可用于蛋白质瞬态结构的研究,揭示蛋白质不同构象之间的转化过程<sup>[11-14]</sup>。采用这套研究手段,我们成功地解析了泛

素以及K63-泛素二聚体(K63-diUb)原子分辨率的动态系综结构,阐明了它们行使功能的分子机制,研究成果发表在*Angew Chem Int Ed*和*eLife*上<sup>[15,16]</sup>,并应邀在国际磁共振学会2015年年会上作报告(<http://ismar2015.ecnu.edu.cn/s/344/t/1082/p/66/c/13240/list.htm>)。

## 1 泛素的非共价二聚相互作用

2008年,Lange等人研究发现Ub在没有结合靶蛋白的时候,其三级结构在ns到 $\mu$ s的时间尺度动态变化,以系综结构形式存在。其中有些结构与结合了靶蛋白后的复合体中Ub的结构类似,因此作者认为,Ub可以通过在三级结构水平上的构象选择来识别不同的靶蛋白<sup>[17]</sup>。但是,Ub在细胞中主要以多聚Ub的形式存在。因此,Ub的四级结构是怎样动态变化,是与Ub生理功能更为相关的一个命题。

我们采用PRE-NMR的技术首次检测到了Ub分子间的非共价二聚相互作用,并解析了Ub蛋白之间的非共价二聚体的系综结构,描述了Ub在四级结构水平的动态变化<sup>[15]</sup>。我们把顺磁探针maleimide-EDTA( $Mn^{2+}$ )分别标记在一个Ub蛋白的K11C,K48C,K63C位点,然后将其与另一个<sup>15</sup>N标记的Ub蛋白按1:1的摩尔比混合,测量分子间的弛豫增强。

分子间的PRE表明Ub分子间存在弱的二聚相互作用,依据这些PRE数据,通过模拟退火计算,我们解析了这类非共价二聚体的系综结构( $K_D \approx$

收稿日期:2015-08-14;修回日期:2015-09-20

\* 通信作者,Email: tanglab@wipm.ac.cn

5 mM)(图 1)。系综结构表明,Ub 的非共价二聚体中,两个亚基的空间取向非常丰富,提示这些构象之间可以相互转换。由于 Ub 的非共价二聚相互作用,Ub 原本溶液暴露的界面被包埋起来( $\beta$ -折叠区域),面积达到  $600 \text{ \AA}^2$ ,由于该界面也是 Ub 与众多靶蛋白相互作用的界面,因此 Ub 有可能通过自身的非共价二聚相互作用来调控它与靶蛋白的相互作用,进而实现对细胞泛素信号通路的控制。另一方

面,Ub 可以形成多种 Lys 连接方式的共价二聚体,结构对比表明,我们解析的 Ub 非共价二聚体的系综结构涵盖了多种共价连接的二聚体(比如 K48-di-Ub, K63-diUb 等)。因此,Ub 非共价的二聚相互作用也有可能存在于共价二聚体中,并调节后者的四级结构,使得不同连接方式的 Ub 二聚体呈现不同的四级结构,行使不同的功能<sup>[18]</sup>。

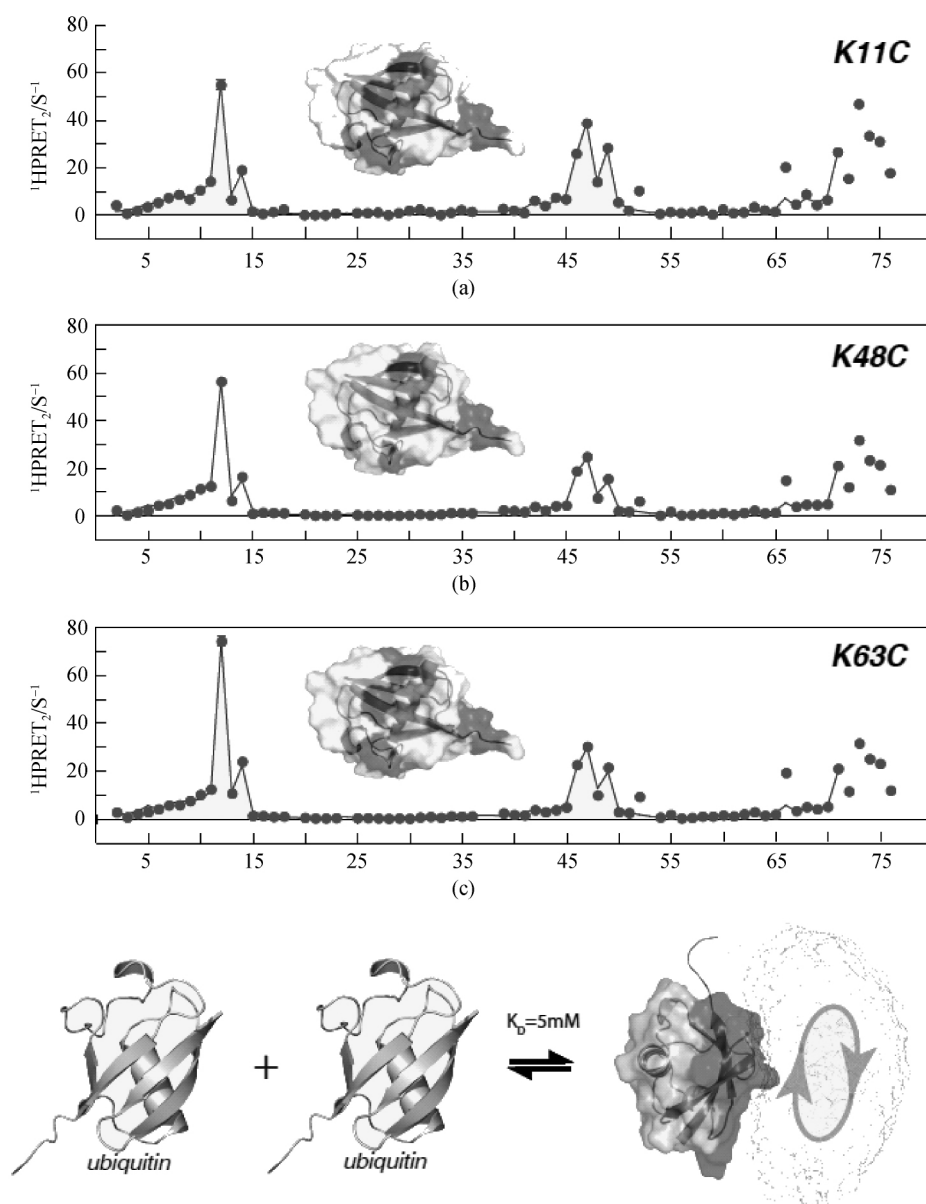


图 1 Ub 非共价二聚相互作用的表征和系综结构。顺磁探针标记位点 a) K11C, b) K48C, c) K63C 检测到的分子间 PRE, 实验值与(红色实心圆圈)与理论计算值(蓝色线)吻合度很好, d) 描述 Ub 的非共价二聚相互作用及其二聚体的系综结构, 红色区域标识相互作用的界面

## 2 K63-diUb 同时存在打开态与两类闭合态结构

2012 年 Yu 等人运用单分子荧光能量共振转移 (smFRET) 的研究手段发现 K63 位连接的 Ub 的二聚泛素 (K63-diUb) 在没有结合靶蛋白的时候同时存在打开态与闭合态两种构象, 该研究首次提出了 K63-diUb 的闭合态。但由于 smFRET 只能提供单个的距离信息, 因此无法计算得到 K63-diUb 高分辨率的系综结构, 也无法对闭合态的构象进行区分。

我们采用了 PRE-NMR 技术, 研究 K63-diUb 的构象分布。我们将顺磁探针 MTS 分别标记在 K63-diUb 的 distal 亚基的 K48C 和 N25C 位点, 测量 proximal 亚基的 PRE。通过对 Ub 间的 PRE 约束进行优化拟合, 我们得到了 K63-diUb 的系综结构。结构分析表明, K63-diUb 除了有打开态以外, 还存在有两类闭合态结构(图 2)<sup>[16]</sup>, 我们称之为 C1 和 C2: 打开态与 C1, C2 的比例分别是 30%, 52.5%, 17.5%。其中, C1 态的结构与结合了负责启动天然免疫 NF-κB 通路的 A20 蛋白的复合体中的 K63-diUb 的结构相似, C2 态的结构与结合了负责终止天然免疫 NF-κB 通路的 TAK1 的复合体中的 K63-diUb 的结构相似。进一步, 我们通过 K63-diUb 的 Ub 之间的作用界面引入特定的突变来改变打开态、C1、C2 三者之间的比例。我们发现, K63-diUb 已有的构象态的比例与其和相应靶蛋白的结合强度相关, 即 K63-diUb 打开态的比例升高时, 和打开态相作用的相应靶蛋白与其结合就变强, 而闭合态 C1 或 C2 的比例降低时, 与其相作用的靶

蛋白的结合则减弱。综上, 我们的结果表明, K63-diUb 的三个构象态之间互相转化, 以构象选择机制识别来不同靶蛋白, 开启相应的信号通路(图 3)。

## 3 小结

Ub 不仅可以自身三级结构的变化识别不同的靶蛋白, 更可以通过非共价的二聚相互作用调

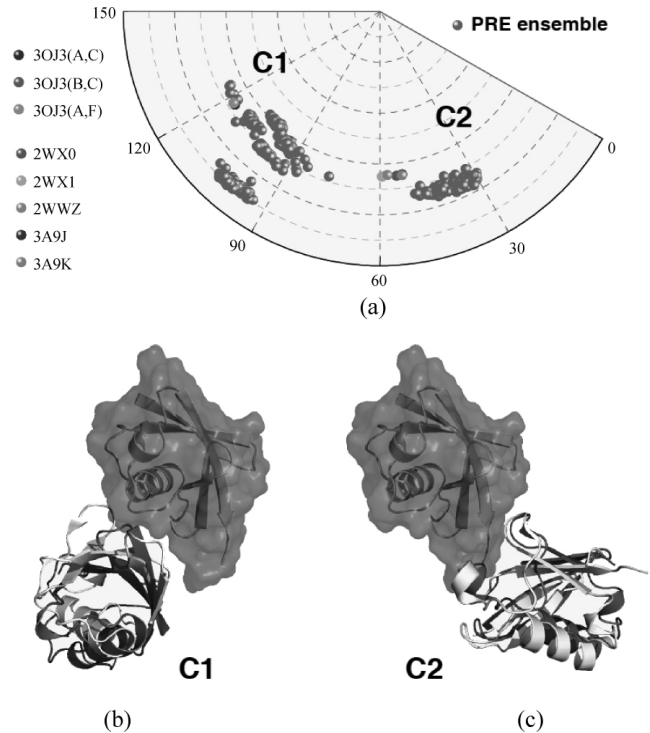


图 2 K63-diUb 的两类闭合态结构。a), 闭合态结构通过降维处理投影后可以明显区分为两类, 其中有些构象和 K63-diUb 复合体中的构象相似; b), K63-diUb 结合 A20 NZF 和 TAK1/TAB2 ZnF4 靶蛋白后的结构 (红色和灰色卡通) 分别与 C1 和 C2 中的一个构象相近 (红色和蓝色卡通)

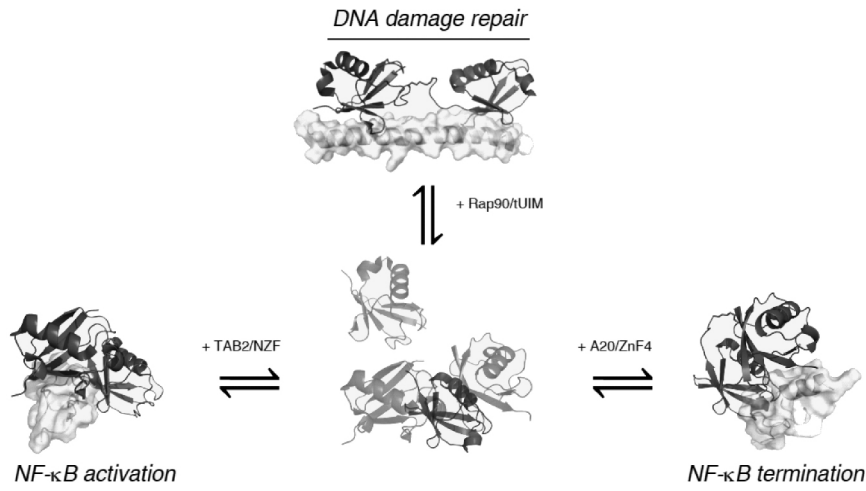


图 3 K63-diUb 信号通路。K63-diUb 同时存在打开态与两类闭合态构象, 三者之间相互转换, 识别不同的靶蛋白, 启动不同的细胞信号通路

整各个 Ub 亚基之间的相互作用和空间排列,进而调节它与靶蛋白的相互作用。Ub 之间的非共价的二聚相互作用与 Ub 之间的共价连接,相互影响、共同作用,决定了多聚 Ub 的四级结构及其功能。本项目所揭示的泛素多聚体四级结构的动态特征为研究其他共价连接方式的多聚 Ub 的动态结构和功能奠定了基础。

**致谢** 本工作受到了中国科技部重大科学研究计划(项目批准号:2013CB910200)、国家自然科学基金(项目批准号:31225007,31170728)以及中国博士后基金(项目批准号:2015M571860)的资助。

### 参 考 文 献

- [1] Kulathu Y, Komander D. Atypical ubiquitylation—the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13: 508—523.
- [2] Komander D, Rape M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 203—229.
- [3] Komander D. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37: 937—953.
- [4] Chen J, Chen ZJ. Regulation of NF- $\kappa$ B by ubiquitination. *Curr Opin Immunol*, 2013, 25: 4—12.
- [5] Cook WJ, Jeffrey LC, Carson M, Chen Z, Pickart CM. Structure of a diubiquitin conjugate and a model for interaction with ubiquitin conjugating enzyme (E2). *J Biol Chem*, 1992, 267: 16467—16471.
- [6] Cook WJ, Jeffrey LC, Kasperek E, Pickart CM. Structure of tetraubiquitin shows how multiubiquitin chains can be formed. *J Mol Biol*, 1994, 236: 601—609.
- [7] Phillips CL, Thrower J, Pickart CM, Hill CP. Structure of a new crystal form of tetraubiquitin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2001, 57: 341—344.
- [8] Weeks SD, Grasty KC, Hernandez-Cuebas L, Loll PJ. Crystal structures of Lys-63-linked tri- and di-ubiquitin reveal a highly extended chain architecture. *Proteins*, 2009, 77: 753—759.
- [9] Datta AB, Hura GL, Wolberger C. The structure and conformation of Lys63-linked tetraubiquitin. *J Mol Biol*, 2009, 392: 1117—1124.
- [10] Henzler-Wildman K, Kern D. Dynamic personalities of proteins. *Nature*, 2007, 450: 964—972.
- [11] Tang C, Iwahara J, Clore GM. Visualization of transient encounter complexes in protein-protein association. *Nature*, 2006, 444: 383—386.
- [12] Bermejo GA, Strub MP, Ho C, Tjandra N. Ligand-free open-closed transitions of periplasmic binding proteins; the case of glutamine-binding protein. *Biochemistry*, 2010, 49: 1893—1902.
- [13] Kim YC, Tang C, Clore GM, Hummer G. Replica exchange simulations of transient encounter complexes in protein-protein association. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 12855—12860.
- [14] Liu Z, Gong Z, Dong X, Tang C. Transient Protein-Protein Interactions Visualized by Solution NMR. *Biochim Biophys Acta*, 2015. DOI: 10.1016/j.bbapap.2015.04.009.
- [15] Liu Z, Zhang WP, Xing Q, Ren X, Liu M, Tang C. Noncovalent dimerization of ubiquitin. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 469—472.
- [16] Liu Z, Gong Z, Jiang WX, Yang J, Zhu WK, Guo DC, et al. Lys63-linked ubiquitin chain adopts multiple conformational states for specific target recognition. *elife*, 2015, 4: e05767.
- [17] Lange OF, Lakomek NA, Fares C, Schroder GF, Walter KF, Becker S, et al. Recognition dynamics up to microseconds revealed from an RDC-derived ubiquitin ensemble in solution. *Science*, 2008, 320: 1471—1475.
- [18] Wang Y, Tang C, Wang E, Wang J. PolyUbiquitin chain linkage topology selects the functions from the underlying binding landscape. *PLoS Comput Biol*, 2014, 10: e1003691.

## Dynamical and functional studies of mono-ubiquitin and poly-ubiquitin

Zhu Liu<sup>1,2</sup>    Zhou Gong<sup>1</sup>    Chun Tang<sup>1</sup>

(1. CAS Key Laboratory of Magnetic Resonance in Biological Systems, State Key Laboratory of Magnetic Resonance and Atomic Molecular Physics, Wuhan Institute of Physics and Mathematics of the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071; 2. Department of Pharmacology, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058)

**Key words** ubiquitin; protein dynamics; NMR; conformational selection