

本文引用:宋迪,杨帅,刘璐,等.泛素化修饰对干扰素基因刺激因子介导的固有免疫信号通路的调控[J].新乡医学院学报,2017,34(4):247-250. DOI:10.7683/xyxyxb.2017.04.001.

【国家自然科学基金专题述评】

泛素化修饰对干扰素基因刺激因子介导的固有免疫信号通路的调控

宋迪,杨帅,刘璐,杨波,王洁  
(新乡医学院医学检验学院,河南 新乡 453003)

**摘要:** 自20世纪70年代发现泛素可以调节蛋白降解过程后,科研人员针对泛素化修饰相关问题开展了一系列研究。目前已阐明泛素是一种多功能的分子标志物,它可以通过蛋白酶体依赖与非蛋白酶体依赖2种途径来调控各种细胞过程。多聚泛素链与靶蛋白之间不同的连接方式决定了靶蛋白特定的生理和病理功能。近年来研究发现,泛素化修饰在宿主抗胞内RNA或DNA病毒感染的过程中起到了至关重要的作用,而干扰素基因刺激因子(STING)是抗病毒感染中的关键分子。因此,本文主要总结了泛素化修饰对STING调控的研究进展,并讨论了在今后的研究中有待解决的一些关键问题。

**关键词:** 泛素化修饰;干扰素基因刺激因子;调控;固有免疫信号通路  
**中图分类号:** R392.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2017)04-0247-04

多数蛋白质在翻译后会通过某些小的化学官能团进行共价修饰,这一过程称为翻译后修饰(post-translational modification, PTM),这些修饰拓宽了靶蛋白在时间和空间上的作用,从而达到调控相应的生物过程的目的。PTM的官能团不仅包括小分子,还包括肽类,如泛素和泛素样蛋白。泛素是一种高度保守的小蛋白(包含76个氨基酸),相对分子质量为8 500,在真核生物中广泛表达,且具有高度保守性。泛素最初被认为是蛋白酶体依赖性降解的标志<sup>[1]</sup>,由泛素控制的蛋白质降解过程可清除错误的蛋白质,HERSHKO等<sup>[2]</sup>因这一发现而被授予2004年的诺贝尔化学奖。之后,科学家们发现泛素化修饰有多种形式,其也可参与免疫功能、细胞周期、DNA修复、细胞生长等的调控,在这些过程中均有重要作用<sup>[3]</sup>。另外,免疫功能紊乱、神经退行性病变以及癌症的发生均与蛋白质降解异常有关,还有多种疾病也与泛素化修饰紊乱相关。因此,探讨泛素化修饰的作用机制,有助于解释遗传信息的调控和多种疾病的发生机制。

1 泛素化修饰

泛素分子在一系列特殊酶的作用下,将细胞内的蛋白质分类,从中选出靶蛋白分子,并对靶蛋白进

行特异性修饰的过程被称为泛素化。泛素化是一种依赖三磷酸腺苷(adenosinetriphosphate, ATP)的、涉及3类酶的酶级联反应。参与整个过程的有泛素分子、底物蛋白、蛋白酶体、少量泛素激活酶(ubiquitin-activating enzyme, E1)、泛素结合酶(ubiquitin-conjugating enzyme, E2)、大量泛素连接酶(ubiquitin-protein ligase, E3)和去泛素化酶(deubiquitinating enzyme, DUB),共同构成了精确的泛素化系统(ubiquitin-pro-teasome system, UPS)<sup>[4-6]</sup>。泛素化过程分为3个步骤:第1步, E1的半胱氨酸残基与位于泛素C末端的甘氨酸残基在ATP供能下形成硫酯键;第2步,在E1的传递下,被激活的泛素转移到E2;第3步,泛素经E3的催化从E2转移到底物上,此过程修饰了底物。在人体中,存在2种E1、约40种E2以及百余种E3。泛素化可被DUB动态转变,这种酶种类繁多,人体中约有100多种<sup>[7-8]</sup>。

单个泛素修饰蛋白质的赖氨酸残基,称之为单泛素化;而蛋白质的赖氨酸残基被泛素链修饰,称之为多聚泛素化,这2种均是蛋白质的泛素化。而后者又可分为线性泛素化和非线性泛素化。顾名思义,泛素分子N、C端首尾相连,前一个泛素分子的甲硫氨酸残基与后一个的甘氨酸残基形成肽键,即形成线性泛素化;而非线性泛素化也是N、C端相连,但不同的是多个泛素分子依次交联在一起<sup>[9-11]</sup>。

泛素含有7种赖氨酸,即K6、K11、K27、K29、K33、K48和K63,与另一个泛素连接方式不同,会形成不同的多聚泛素链序列。而这其中研究最多的是K48和K63连接的多泛素化修饰, K48连接的多泛素化修饰一般介导靶蛋白的蛋白酶体途径的降解,

DOI:10.7683/xyxyxb.2017.04.001  
收稿日期:2016-12-27  
基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(编号:31600697)。  
作者简介:宋迪(1992-),女,河南南阳人,硕士研究生在读,研究方向:临床检验诊断学。  
通信作者:王洁(1982-),女,河南滑县人,博士,讲师,主要从事病毒感染免疫方面的研究;E-mail:ayaia2004@163.com。

而多种非蛋白裂解功能,如膜运输和信号转导等则由 K63 连接的多泛素化修饰介导<sup>[12-14]</sup>。

泛素化在蛋白质的定位、功能、调节、降解和代谢中均有十分重要的作用。同时,在调控许多信号通路蛋白的激活、定位、稳定性及亲和力时泛素化修饰也起到了作用,并且对于抗病毒免疫信号通路非常重要<sup>[7,15]</sup>,如视黄酸诱导基因蛋白 I (retinoic acid inducible gene-I, RIG-I) 被三结构域蛋白 4 (tripartite motif containing protein 4, TRIM4) 进行 K63 连接的多泛素化修饰并促进其激活<sup>[16]</sup>。提高或抑制相关抗病毒天然免疫信号,使宿主过度应答的不利影响最小化,这些均是精准的泛素化过程所起到的重要作用。反之,如果泛素化修饰发生了异常,那么,将导致自身免疫性疾病或病毒的传播。所以,泛素化修饰是近年来生物化学研究的一个重大成果,越来越多的重要作用被发现,已经成为新的研究热点。

## 2 干扰素基因刺激因子 (stimulator of interferon genes, STING)

人体的第 1 道防线是固有免疫,其对于防御病原微生物入侵宿主起到了屏障作用。在病原体入侵宿主时,病原相关分子模式 (pathogen associated molecular pattern, PAMP) 被胚系细胞基因编码的模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 所识别,可以使宿主的固有免疫应答反应激活,在诱导 I 型干扰素及炎性因子表达的同时,又诱导适应性免疫反应,达到抑制感染扩散的目的。目前,已知的识别病原核酸并诱导 I 型干扰素的模式识别受体有 Toll 样受体 (Toll like receptor, TLR)、RIG-I 样受体 (RIG-I like receptor, RLR) 及 DNA 识别受体等。

STING 是一种新的 I 型干扰素刺激因子,能够识别细菌和病毒感染入侵,识别之后可启动机体的防御和免疫反应。该分子位于 TANK 结合激酶 1 (TANK-binding kinase-1, TBK1) 上游,能够应答 B 型双链 DNA 与 5'-3p 双链 RNA,同时激活干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 信号通路或 I 型干扰素信号通路。从形态上来说,STING 的 C 端结构域 (C-terminal helicase domain, CTD) 为球形,位于细胞质中,可能含有多种信号模序<sup>[17]</sup>。研究认为,STING 的跨膜结构域有 4 个,其中第 3 个跨膜结构域负责将 STING 定位到线粒体外膜上<sup>[18-19]</sup>; CAMBIER 小组同意以上观点,并补充 4 个跨膜结构域,除了定位于线粒体上,在细胞膜上也存在少量的跨膜结构域<sup>[20]</sup>;而 ISHIKAWA 等<sup>[17]</sup>则认为有 5 个跨膜结构域存在于 STING 的 N 端,静息状态时,STING 主要在内质网上存在,同时在内质网与线粒体相邻的线粒体相关膜区域 (mitochondria-associat-

ed membranes, MAMs) 上也可能分布。

STING 最初被发现时是作为一种干扰素刺激因子,并在大量组织的多种细胞中广泛表达,由此推测其在免疫调节方面可能具有重要的功能。ISHIKAWA 等<sup>[17]</sup>及 SHARMA 等<sup>[21]</sup>研究表明,STING 在介导固有免疫反应中举足轻重,这些固有免疫应答反应可被胞内细菌 DNA、病毒 DNA 甚至寄生虫 DNA 所诱导产生,且其在病原 RNA 介导的 I 型干扰素产生的通路中发挥作用。由于 STING 分子中并不存在 DNA 结合结构域,当人体被细菌、病毒入侵时,STING 需要借助细胞内其他模式识别受体来对病原微生物进行识别,而 STING 主要作为通路的接头蛋白诱导下游信号转导来发挥作用。但最近有研究表明,在诱导 I 型干扰素的表达时,STING 也可直接作为环鸟嘌呤核苷酸-腺嘌呤核苷酸 (cyclic guanine nucleotide-adenine nucleotide, cGAMP) 的识别受体<sup>[22]</sup>,关于 STING 是否还能作为其他病原相关分子模式的直接识别受体还有待进一步研究。

## 3 STING 的泛素化修饰

在深入理解固有免疫信号通路方面,宿主细胞对异源性胞内 DNA 的感知和识别机制的研究是一个迅速发展的领域。HEMMI 等<sup>[23]</sup>和 STETSON 等<sup>[24]</sup>研究发现,位于浆细胞样树突状细胞内涵体膜表面的 TLR9 可以识别细胞外细菌的 DNA。然而,在 TLR9 缺失的细胞中,I 型干扰素基因的表达也可被胞内的异源 DNA 强烈诱导,这表明还有可以识别 DNA 的特异受体在细胞质中存在。细胞质中的 DNA 结合蛋白质如 cGAMP、DDX41 和 Mre11 等可以识别细胞质中的 DNA,强烈诱导 I 型干扰素的表达<sup>[25-27]</sup>。而细胞质中的受体识别了病原微生物的 DNA 或 RNA 后,其 I 型干扰素基因的表达主要通过 STING-TBK1-IRF3 信号转导来起始。DNA 识别受体与配体结合后,均将信号传递到位于内质网上的接头蛋白 STING。STING 受到了细胞质异源 DNA 的刺激而迅速进行二聚化和转位,从高尔基体经内质网进入核外周小体;与此同时,TBK1 也会聚集到核外周小体上<sup>[28-29]</sup>。DNA 诱导的 STING-TBK1 复合体的装配对 TBK1 激活以及随后的 IRF3 转录因子的磷酸化和入核至关重要,是其必需的步骤<sup>[30]</sup>,此后受到激活的 TBK1 可以磷酸化 IRF3,随后 IRF3 发生二聚化和入核,从而起始靶基因的转录和表达。

Trim 家族的 2 个成员 Trim32 和 Trim56 介导的 K63 泛素化对 STING 信号活性进行严格调控。TSUCHIDA 等<sup>[31]</sup>发现,胞内 poly (dA:dT) 和 poly (I:C) 的刺激可诱导 I 型干扰素诱导物响应,Trim56 可促进此过程,这与 STING 在胞内 DNA 和 RNA 刺

激中的作用相似。然而,Trim56与poly(dA:dT)并没有直接结合,从而排除Trim56作为DNA识别受体诱导STING依赖的信号通路。研究人员从生物化学分析结果发现,Trim56可通过结合STING的C-末端而诱导STING的K63泛素化修饰。STING的K150位突变后,Trim56不能再对其进行泛素化修饰,也不能诱导干扰素- $\beta$ 的产生,这表明STING中K150位赖氨酸残基对Trim56介导的K63连接的泛素化修饰非常重要。在异源DNA或RNA刺激下,E3泛素连接酶Trim56可催化STING的K150赖氨酸位点的K63连接的泛素化修饰,这种修饰可以促进STING的二聚化,进而激活下游信号通路。除Trim56外,E3泛素连接酶Trim32也可催化STING发生K63多聚泛素化修饰<sup>[32]</sup>。STING被Trim32泛素化修饰,可提高STING介导的干扰素- $\beta$ 产生。而病毒感染时,Trim32的过表达可增强干扰素- $\beta$ 的表达和细胞抗病毒反应。同时,干扰Trim32表达则具有相反效果。Trim32与STING的相互作用部位位于线粒体和内质网。Trim32通过其E3泛素连接酶的活性对STING的K20/150/224/236位进行K63泛素化,从而促进STING与TBK1相互作用。Trim32通过对STING进行K63泛素化调节下游信号通路,在抗RNA和DNA病毒感染的固有免疫应答反应中发挥重要作用。野生型的Trim56或Trim32过表达均可增强STING和TBK1的相互作用,表明泛素化对招募TBK1的重要性。

除了Trim56和Trim32的正向调控,STING还可以通过K48泛素化被蛋白酶体降解来抑制信号传递。ZHONG等<sup>[19]</sup>使用全长的STING作为诱饵蛋白进行了酵母双杂交筛选,结果发现,E3泛素连接酶RNF5与STING相互作用。野生型的RNF5的过表达,可以促进STING的K48型泛素化修饰以及降解。此外,ZHONG等<sup>[19]</sup>确定了STING中的K150是K48泛素化修饰的关键残基,并认为机体通过RNF5对STING的泛素化和降解进行负调节反馈以避免免疫系统在病毒感染时的过度响应。有研究表明,E3连接酶Trim30 $\alpha$ 与STING的相互作用可作为对胞内DNA应答反应的关键调节器,可抑制DNA激活的免疫应答反应<sup>[33]</sup>。该研究还发现,K275位赖氨酸是Trim30 $\alpha$ 靶定STING进行泛素化修饰的位点,过表达的Trim30 $\alpha$ 可以通过K48泛素化修饰促进STING的降解,Trim30 $\alpha$ 可作为机体对DNA病毒先天免疫应答的一种重要的负反馈调节因子<sup>[33]</sup>。

QIN等<sup>[34]</sup>研究发现,定位在内质网上的RNF26催化STING发生K11链型的泛素化修饰。如今,K11的泛素化修饰的精确作用并没有被充分阐明,但是,STING的降解可以被RNF26阻止,原因主要是通

过其诱导的泛素化修饰以替换RNF5在K150介导的K48链泛素化修饰。时期不同,RNF26的作用也不相同。在病毒感染早期,RNF26可以阻止RNF5引起的STING的降解,促进了I型干扰素的表达,其主要通过催化形成K11多聚泛素链来竞争STING的K48位泛素化修饰位点;而在病毒感染的晚期,RNF26却抑制了I型干扰素的表达,主要通过促进IRF3的溶酶体降解发挥作用。

ARIMOTO等<sup>[35]</sup>研究发现,K27多聚泛素链并不像蛋白酶体降解相关的K48链或者调节相关的K63聚泛素链那样得到很好的研究,因为,研究很少发现有底物与K27聚泛素链相结合。WANG等<sup>[36]</sup>研究发现,在STING与TBK1同时聚集到核外周小体的生物学过程中,在内质网E3泛素连接酶自分泌运动因子受体(autocrine motility factor receptor, AMFR)或胰岛素诱导基因(insulin induced gene 1, INSIG1)缺失的细胞中,由细胞质内DNA刺激引发的STING介导的抗病毒基因表达显著减少。其深入的分子机制研究表明,STING通过INSIG1招募AMFR,AMFR催化STING发生K27链型的泛素化修饰;此泛素链作为分子平台招募TBK1,将STING和TBK1转移到核外周小体上,即K27多聚泛素链对于促进TBK1核微粒体转位是必不可缺的。这无疑会促进研究人员进一步深入研究,确定K27多聚泛素链调节细胞质DNA识别信号通路的具体机制。

## 4 结束语和展望

对宿主维稳和生存来说,病毒感染是重要的威胁之一,所以,固有免疫细胞信号转导是当前医学研究领域的热点,相关细胞信号转导通路的精细调控机制有待全面而深入的阐释。近年来,关于STING泛素化修饰相关内容的研究进展迅速,发现了关于STING的多种泛素化修饰,如STING被K63、K48、K11和K27多聚泛素链修饰,以及相关的多种E3泛素连接酶。这些多聚泛素链之间不同的联系拓宽了STING的功能谱,从而决定了STING信号的强度和持续时间。目前,对STING信号通路的阐释是一个新的热点,但这方面的研究还不够深入,信号分子还有待被发现,对其研究依然处于起步阶段。在不远的将来,新的重要信号分子及其作用机制可能会被科研人员发现,泛素如何介导它们功能的调节有望加深人们对细胞质内DNA识别受体信号通路的理解。

## 参考文献:

- [1] CAJEE U F, HULL R, NTWASA M. Modification by ubiquitin-like proteins: significance in apoptosis and autophagy pathways[J]. *Int*

- J Mol Sci*, 2012, 13(9): 11804-11831.
- [2] HERSHKO A, CIECHANOVER A, HELLER H, *et al.* Proposed role of ATP in protein breakdown; conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77(4): 1783-1786.
  - [3] COHEN P. Immune diseases caused by mutations in kinases and components of the ubiquitin system [J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(6): 521-529.
  - [4] PICKART C M. Mechanisms underlying ubiquitination [J]. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 503-533.
  - [5] DYE B T, SCHULMAN B A. Structural mechanisms underlying posttranslational modification by ubiquitin-like proteins [J]. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2007, 36: 131-150.
  - [6] NEUTZER M, NEUTZER A. Enzymes of ubiquitination and deubiquitination [J]. *Essays Biochem*, 2012, 52: 37-50.
  - [7] HEATON S M, BORG N A, DIXIT V M. Ubiquitin in the activation and attenuation of innate antiviral immunity [J]. *J Exp Med*, 2016, 213(1): 1-13.
  - [8] HARHAJ E W, DIXIT V M. Deubiquitinases in the regulation of NF-kappa B signaling [J]. *Cell Res*, 2011, 21(1): 22-39.
  - [9] DESHAIES R J, JOAZEIRO C A. RING domain E3 ubiquitin ligases [J]. *Annu Rev Biochem*, 2009, 78: 399-434.
  - [10] KOMANDER D, RAPE M. The ubiquitin code [J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 203-229.
  - [11] KIRISAKO T. A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains [J]. *EMBO J*, 2006, 25(20): 4877-4887.
  - [12] SHI H X. Mitochondrial ubiquitin ligase MARCH5 promotes TLR7 signaling by attenuating TANK action [J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(5): e1002057.
  - [13] CHEN Z J, SUN L J. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling [J]. *Mol Cell*, 2009, 33(3): 275-286.
  - [14] THROWER J S, HOFFMAN L, RECHSTEINER M, *et al.* Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal [J]. *EMBO J*, 2000, 19(1): 94-102.
  - [15] LIU X, WANG Q, PAN Y, *et al.* Sensing and responding to cytosolic viruses invasions; an orchestra of kaleidoscopic ubiquitinations [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015, 26(3): 379-387.
  - [16] YAN J, LI Q, MAO A P, *et al.* TRIM4 modulates type I interferon induction and cellular antiviral response by targeting RIG-I for K63-linked ubiquitination [J]. *J Mol Cell Biol*, 2014, 6(2): 154-163.
  - [17] ISHIKAWA H, BARBER G N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling [J]. *Nature*, 2008, 455(7213): 674-678.
  - [18] ZHONG B. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation [J]. *Immunity*, 2008, 29(4): 538-550.
  - [19] ZHONG B. The ubiquitin ligase RNF5 regulates antiviral responses by mediating degradation of the adaptor protein MITA [J]. *Immunity*, 2009, 30(3): 397-407.
  - [20] JIN L. MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(16): 5014-5026.
  - [21] SHARMA S. Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the plasmodium falciparum genome [J]. *Immunity*, 2011, 35(2): 194-207.
  - [22] BURDEET D L. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP [J]. *Nature*, 2011, 478(7370): 515-518.
  - [23] HEMMI H. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA [J]. *Nature*, 2000, 408(6813): 740-745.
  - [24] STETSON D B, MEDZHITOV R. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response [J]. *Immunity*, 2006, 24(1): 93-103.
  - [25] SUN L, WU J, DU F, *et al.* Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 786-791.
  - [26] UNTERHOLZNER L. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(11): 997-1004.
  - [27] KONDO T. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(8): 2969-2974.
  - [28] SAITOH T. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(49): 20842-20846.
  - [29] ISHIKAWA H, MA Z, BARBER G N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity [J]. *Nature*, 2009, 461(7265): 788-792.
  - [30] PALUDAN S R, BOWIE A G. Immune sensing of DNA [J]. *Immunity*, 2013, 38(5): 870-880.
  - [31] TSUCHIDA T. The ubiquitin ligase TRIM56 regulates innate immune responses to intracellular double-stranded DNA [J]. *Immunity*, 2010, 33(5): 765-776.
  - [32] ZHANG J, HU M M, WANG Y Y, *et al.* TRIM32 protein modulates type I interferon induction and cellular antiviral response by targeting MITA/STING protein for K63-linked ubiquitination [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287: 28646-28655.
  - [33] WANG Y, LIAN Q, YANG B, *et al.* TRIM30α is a negative-feedback regulator of the intracellular DNA and DNA virus-triggered response by targeting STING [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(6): e1005012.
  - [34] QIN Y. RNF26 temporally regulates virus-triggered type I interferon induction by two distinct mechanisms [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(9): e1004358.
  - [35] ARIMOTO K. Polyubiquitin conjugation to NEMO by tripartite motif protein 23 (TRIM23) is critical in antiviral defense [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(36): 15856-15861.
  - [36] WANG Q. The E3 ubiquitin ligase AMFR and INSIG1 bridge the activation of TBK1 kinase by modifying the adaptor STING [J]. *Immunity*, 2014, 41(6): 919-933.

(本文编辑:徐刚珍)