

# 细胞内一种耗能蛋白质降解途径的发现 ——2004年诺贝尔化学奖工作介绍

昌增益<sup>1</sup>, 焦旺旺<sup>2</sup>

(1. 北京大学生命科学学院生物化学与分子生物学系, 北京 100871;

2. 清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

**摘要:** 2004年诺贝尔化学奖授予 Aaron Ciechanover, Avram Hershko 和 Irwin Rose 三位科学家, 以表彰他们在上世纪 80 年代发现了泛素介导的蛋白质降解过程。文章简单介绍了该现象的科学发现历程, 并讨论了该科学发现历程给予我们的启示。

**关键词:** 2004年诺贝尔化学奖; 能量依赖型蛋白质降解; 细胞内蛋白质降解; 泛素

**中图分类号:** Q51

## 1 生物有机体的内环境是一种稳态

自 19 世纪中叶以来, 生物学家逐渐发现生命有机体内环境中的化学组成和物理性质等都处于一种相对稳定的动态平衡状态。这种“稳态 (homeostasis)”涉及诸如脊椎动物血液中各种有机成分和无机离子组分浓度及 pH 值的相对恒定等等。这种稳态现象的揭示进而导致生命调节现象的发现: 即生物机体代谢过程是受到高度调控的。当某种成分 (如氨基酸、核苷酸等) 在机体内的含量太高时, 其合成过程就会受到抑制, 而当其含量太低时, 其合成过程就会得到加强。

## 2 生物有机体中的生命活动执行者——蛋白质也处于动态平衡状态

蛋白质是生命活动的直接执行者。自从大约 1750 年以来, 被我们现在称之为蛋白质的生命物质一直是化学家和生物学家关注和研究的中心。相对而言, 人们关注的热点主要在于蛋白质的化学结构和生物学功能, 以及它们在细胞内被合成的机制 (这是 20 世纪 60 年代破译的遗传密码的关键内容之一)。而对于蛋白质的降解过程人们最初的研究集中在对动物消化蛋白质食物过程的理解。这样的过程是在细胞外发生的, 而且并不消耗任何能量, 是相对被动的过程。像胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶等参与这些过程的蛋白质水解酶都一直是研究蛋白质的经典模型。

对于细胞内的蛋白质降解过程, 人们在很长时

间内关注的焦点在于, 发生在一种被称为溶酶体的细胞器中的蛋白质的降解过程。这是一种降解包括蛋白质、核酸、糖类和脂类等主要生物分子的, 一个由单层细胞膜包围的, 内部为酸性环境的细胞器。在溶酶体中发生的蛋白质降解过程与发生在消化道中的过程似乎非常类似。对于发生于溶酶体中的蛋白质降解过程, 人们主要关注的是细胞内什么样的蛋白质被输送到溶酶体中, 它们又是如何被输送进去等问题。

对于细胞内的耗能性 (即依赖于 ATP 的) 主动蛋白质降解过程, 尽管在 20 世纪 50 年代就已经被人们所发现<sup>[1]</sup>, 但因为在很长时间内, 蛋白质降解方面的研究工作都集中在溶酶体上, 所以大家一般认为这种能量的需求可能仅仅涉及底物蛋白被运输进入溶酶体的过程, 或者维持溶酶体中的酸性环境所需进行的跨膜质子转运过程等。所以对这种发生于细胞内的耗能蛋白质降解过程机制的理解在 20 多年内几乎毫无进展!

## 3 对生物体内消耗能量的蛋白质降解过程机制的认识依赖于一种无细胞体系的成功建立

70 年代后期, 哈佛大学医学院生理学系

收稿日期: 2004-11-24

通讯作者: 昌增益, 电话: (010)62758822, 传真: (010)62751526

E-mail: changzy@pku.edu.cn

Alfred L. Goldberg 领导的实验室成功地建立了基于兔网织红细胞的无细胞抽提物体系, 这种体系能像完整网织红细胞一样, 使掺入了氨基酸类似物的蛋白质发生快速的依赖于 ATP 的降解<sup>[2]</sup>。正如对诸如发生于细胞内的葡萄糖发酵、利用 RNA 作为模板的蛋白质翻译、DNA 的复制和 RNA 的转录等等生命过程的生物化学机制的了解进程一样, 成功地建立这种无细胞抽提物体系对研究工作而言, 是至关重要的一个起点。Aaron Ciechanover、Avram Hershko 和 Irwin Rose 正是充分利用了这种前人为他们奠定的基础, 才有可能在仅仅 5 年的时间内 (1978~1983) 就分析清楚了参与这种过程的各种蛋白质成分, 揭示出细胞内蛋白质耗能降解的分子机制, 从而被授予了 2004 年的诺贝尔化学奖。

从科学史角度看, 这里我们不得不提出一个有意思的问题。那就是, Goldberg 实验室为何未能利用他们成功建立的无细胞网织红细胞体系将这种依赖于 ATP 的蛋白质降解过程的机制揭示出来、从而与今年的诺贝尔奖无缘呢?

从发表的论文来看, Goldberg 实验室在 1978~1983 年这段时间的研究方向还是细胞内的蛋白质降解, 但他们似乎侧重于理解完整哺乳动物细胞和大肠杆菌细胞中发生的蛋白质降解的调节问题, 比如蛋白质的寿命与其分子大小、等电点高低以及环境因子等之间的关系等方面。有趣的是 Goldberg 实验室这期间有多篇论文发表在 Nature, Science 和 Cell 这样的顶尖刊物上, 而发表在像 PNAS, Journal of Biological Chemistry 这样的刊物上的就更多了, 在研究细胞内蛋白质降解方面, 它的确是一个多产且非常有威望的实验室。相比之下, Aaron Ciechanover、Avram Hershko 和 Irwin Rose 这三位科学家在这 5 年间发表的论文的数量和档次可能都不如 Goldberg 实验室。他们的第一篇论文, 也是为他们带来诺贝尔奖的最经典的一篇论文, 是发表在 Biochemical and Biophysical Research Communication 杂志上 (的确, 有不少后来获得诺贝尔奖的经典工作开始都发表在这份刊物上!)。导致他们得诺贝尔奖的另外 5 篇论文中, 有 4 篇是发表在 PNAS 上 (可能是因为 Irwin Rose 作为美国科学院院士的特权), 一篇发表在 Journal of Biological Chemistry 上。这一历史经验可能很值得我们回味。作为科学家, 我们的确需要更多思考自己的研究工作的真正发现所在, 以及所研究内容的长远历史价值所在。

## 4 一种热稳定的低分子量多肽 (泛素) 被发现共价修饰将被降解的靶蛋白分子

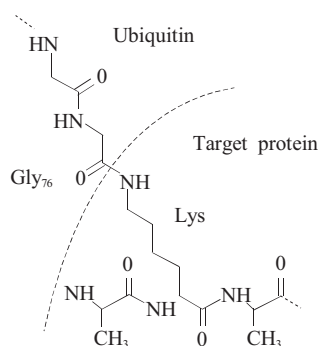
Avram Hershko 最初选择研究蛋白质在细胞内的降解机制是一件颇具启发性的事件。他这方面的研究兴趣始自他做博士后期间。那时, 他做博士后的实验室主要研究方向是皮质类固醇激素促使酪氨酸转氨酶合成量增加的分子机制, 但 Hershko 博士觉得蛋白质合成增加机制研究属于热点领域, 竞争太激烈, 就决定去研究一个不太受重视的影响酪氨酸转氨酶在细胞内水平的另一方面, 即该蛋白质在细胞内的降解机制。他发现当在体外培养的肝癌细胞中加入像氟化物或叠氮化物这样的 ATP 合成抑制剂时, 酪氨酸转氨酶在细胞内的降解过程几乎被完全抑制掉了<sup>[3]</sup>。1971 年他回到以色列后, 其科学研究工作就一直围绕这一方向。在人们热衷于研究蛋白质合成机制时, Hershko 博士却去选择研究蛋白质的降解机制。这与 2002 年诺贝尔生理学或医学奖获得者 Sydney Brenner、H. Robert Horvitz 和 John E. Sulston 在人们热衷于研究细胞的生长分裂机制时, 却去选择研究细胞的死亡机制似乎有异曲同工之妙。

1977 年, Hershko 开始转而利用 Goldberg 实验室建立的网织红细胞抽提物作为研究体系。网织红细胞抽提物中含有大量的血红蛋白, 很大程度上影响了实验的观察和分析, 于是他们尝试利用常规的逐步离子交换层析方法分离假想存在的“一种”依赖 ATP 的蛋白质水解酶。但在用 DEAE-纤维素柱去除抽提物中的大量血红蛋白时, 他们惊奇地发现未被吸附的组分 I (血红蛋白就在其中) 与用 0.5 mol/L 氯化钾从柱子上洗脱下来的组分 II 能互补产生 ATP 依赖型的蛋白质降解活性, 而两种组分单独却不具备这种活性。更不同寻常的是, 未被吸附组分 I 经过长时间高温加热处理 (96°C, 60 min) 后, 这种互补活性仍旧基本保留完好! 进一步的研究表明, 组分 I 的活性成分是一种对热稳定的分子量较低的 (9 000 u) 本身并不具有任何裂解肽键能力的多肽<sup>[4]</sup>。

对这种耗能性蛋白质酶解系统的深入研究工作主要由 Aaron Ciechanover 和 Avram Hershko 在位于以色列海法市的 Technion-Israel 理工学院完成, 突破性进展发生在 1980 年。首先, 当他们用放射

性  $^{125}\text{I}$  标记这种被命名为 APF-1 (active principle of fraction I) 的热稳定多肽, 试图寻找网织红细胞抽提物组分 II (即上述盐洗脱组分) 中与它发生相互作用的蛋白质成分时, 意外地发现在 ATP 存在的条件下, APF-1 可以共价结合到许多蛋白质分子上, 而且这种共价连接键并非二硫键<sup>[5]</sup>。

他们同时还发现, 不管是将 APF-1 用  $^{125}\text{I}$  标记, 还是将底物蛋白溶菌酶用  $^{125}\text{I}$  标记, 都会导致网织红细胞抽提物中出现一组在变性凝胶电泳后位置完全相同的同位素标记蛋白质带。这表明 APF-1 与靶蛋白之间形成了共价连接 (见图 1)。后来这一现象在其它底物蛋白上也得到了重复, 并且发现多个 APF-1 单位可以连接到一个底物蛋白分子上。一个意外的发现是, 这样的 APF-1 多肽经过耗能蛋白质降解过程之后, 完好无损, 可以被重复利用<sup>[6]</sup>。



**Fig.1** Ubiquitin is covalently conjugated to the target proteins via isopeptide linkage between the -COOH group at the C-terminal Gly of ubiquitin and the  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> group of specific Lys residues on the target proteins

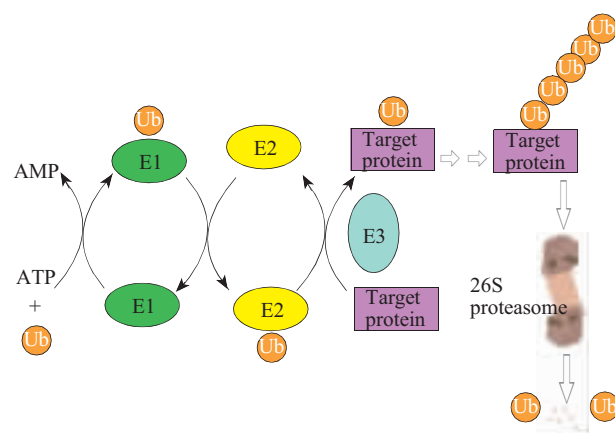
这时, 与 Irwin Rose 同在一个单位 (即美国费城的 Fox Chase 癌症研究中心) 工作的 Arthur L. Haas 实验室的工作表明, 这种 APF-1 多肽与广泛存在于许多生物体中的由 76 个氨基酸组成的泛素蛋白 (Ubiquitin) 是同一种物质<sup>[7]</sup>。

## 5 泛素修饰靶蛋白分子的反应是由三种酶催化完成的

下一步的研究工作自然集中在泛素究竟是怎样修饰靶蛋白分子, 尤其必须鉴定清楚所参与的酶是什么。

首先被揭示的是 ATP 参与这个过程的具体机制。因为发现在反应体系中加入焦磷酸 (PPi) 能够强烈抑制网织红细胞抽提物的 ATP 依赖型蛋白质降解反应, 而且在泛素与底物蛋白形成的异肽键连接 (isopeptide linkage) 中是由泛素提供羧基, 这表明 ATP 激活的很可能是泛素, 而非底物蛋白分子。结果表明, 泛素的确首先以泛素 -AMP 形式被激活。通过测定  $^{32}\text{P}$ PPi-ATP 的交换反应, 催化这一步反应的相应的酶也被鉴定了。意外的发现是, 这种激活泛素的酶竟然也与泛素通过硫酯键形成共价连接。根据这些结果, 一个很自然的推论是: 在催化了泛素被 ATP 激活之后, 这种激活酶分子上有一个巯基可以进一步进攻泛素 -AMP 分子, 从而使得泛素被共价连接到酶蛋白上<sup>[8]</sup>。

在接下来的工作中, 通过利用泛素 - 琼脂糖亲和层析柱, 泛素激活酶被纯化。在纯化过程中, 泛素激活酶 (在有 ATP 的存在下) 通过硫酯键而共价连接在层析柱的泛素分子上, 所以这种方法被称为“共价亲和层析”<sup>[9]</sup>。正是通过巧妙地利用这样一种泛素 - 琼脂糖亲和层析柱, 使得参与将泛素共价连接到靶蛋白分子上的另外两种酶 (相应地被称为 E2 和 E3, 而泛素激活酶就被称为 E1 了) 也很快被鉴定纯化了。也正是通过利用这样的亲和层析方法, Hershko 和 Ciechanover 发现 E2 和泛素之间也通过硫酯键形成了共价连接, 但 E3 是通过非共价键连接到这种亲和层析柱上<sup>[10]</sup>。至此, 将被降解的靶蛋白被泛素修饰的酶催化机制基本明朗。



**Fig.2** A schematic diagram showing the current understanding on the general process of ubiquitin-mediated protein degradation. Multiple ubiquitin units are covalently added to each target proteins via the sequential action of three types of enzymes, E1, E2 and E3. The modified target proteins are then degraded by the action of a multisubunit protein complex called proteasome

正如泛素的普遍存在（发现于所有的真核生物中，但在原核生物中未被发现）所暗示的那样，这种泛素介导的靶蛋白降解过程是一个在生物体中普遍发生的过程。目前这个领域的研究仍在很多实验室活跃地开展着。根据目前的理解，整个蛋白质降解过程如图2中所示。首先在E1的催化下，泛素的C-末端羧基被腺苷单磷酸（AMP）修饰，而后E1蛋白上的一个特定的巯基进攻泛素-AMP，泛素就被转移给了E2，然后在E3的催化下，泛素又从E2转移给即将被降解的靶蛋白。然后如此反复，靶蛋白就被多个泛素分子共价修饰了，形成多泛素靶蛋白。后者进而被26S蛋白酶体识别，而被降解<sup>[9-12]</sup>。

值得一提的是，26S蛋白酶体作为蛋白质降解机器显然是泛素降解系统中一个关键的组分，但它却是由Hough在1986~1987年间分离鉴定的<sup>[11-12]</sup>。在1979年Aaron Ciechanover, Avram Hershko, Irwin Rose分离网织红细胞抽提物时，发现其中一个组分含有一种可以被ATP稳定的蛋白活性组分<sup>[13]</sup>，这很可能就是后来发现的26S蛋白酶体，但由于他们一直把精力集中于鉴定催化泛素修饰反应的关键酶，而把蛋白降解机器的发现工作搁置起来。奇怪的是在很长一段时间内（1979~1986）也没有研究人员继续探究他们的这一发现，这也许反映当时并没有太多的研究人员关注细胞内的蛋白质降解问题。

## 6 细胞内耗能蛋白质降解的生物学意义

正确的三维结构是蛋白质分子发挥功能的前提，细胞具有一套精密的质量监控系统，识别错误合成的蛋白质，使其及时被蛋白酶体清除。有实验数据表明，细胞内新合成的蛋白质大约有30%是错误的<sup>[14]</sup>，显然泛素介导的蛋白质降解系统对于细胞正常的生理功能的发挥是至关重要的。

生命过程是一个精确调控的复杂过程，每一种执行生命活动功能的蛋白质分子都是在某一特定的时间、空间内发挥作用，这就决定扮演不同角色的蛋白质会有不同的寿命。越来越多的实验发现表明，泛素介导的蛋白降解系统不仅仅限于那些错误折叠的蛋白质，还可以降解许多重要的蛋白质底物，从而调控许多重要的生理过程，比如细胞周期

控制、DNA损伤和凋亡、癌症的发生、免疫和炎症反应等<sup>[15]</sup>。

## 7 结束语

我们现在知道在典型的哺乳动物细胞中，只有一种高度保守的泛素蛋白，含有一种或几种E1、十几种E2和几百种E3，不同E3选择特异性决定了哪些蛋白应该被降解，从而实现生理过程的精确调控。如此精确而复杂的识别机制在细胞内是如何实现的呢？

真核生物与古细菌都具有保守的泛素分子，而原核生物中却没有发现泛素的存在，但原核生物内也存在ATP依赖型的蛋白质降解，那么原核生物中的这种蛋白质降解机制与这三位诺贝尔奖获得者所揭示的机制又有什么异同呢？

从细胞内蛋白质的主动降解，到细胞的程序性主动死亡（即细胞凋亡），再到生命个体的自然死亡，都反映了生命有生就必须有死这一哲学道理。作为生物学家，在我们思考和分析生命现象的时候，可能需要时时考虑到这么一个方面。

### 参考文献：

- [1] Simpson MV. The release of labeled amino acids from the proteins of rat liver slices. *J Biol Chem*, 1953,201:143~154
- [2] Etlinger JD, Goldberg AL. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977,74: 54~58
- [3] Hershko A, Tomkins GM. Studies on the degradation of tyrosine aminotransferase in hepatoma cells in culture. *J Biol Chem*, 1971,246:710~714
- [4] Ciechanover A, Hod Y, Hershko A. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1978,81: 1100~1105
- [5] Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA. Proposed role of ATP in protein breakdown: Conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980,77: 1783~1786
- [6] Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980,77:1365~1368
- [7] Wilkinson KD, Urban MK, Haas AL. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of Rabbit Reticulocytes. *J Biol Chem*, 1980,255:7529~7532

- [8] Ciechanover A, Heller H, Katz-Etzion R, Hershko A. Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981,77: 1365~1368
- [9] Ciechanover A, Elias S, Heller H, Hershko A. "Covalent affinity" purification of ubiquitinactivating enzyme. *J Biol Chem*, 1982,257:2537~2542
- [10] Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A. Components of ubiquitin-protein ligase system. *J Biol Chem*, 1983,258: 8206~8214
- [11] Hough R, Pratt G, Rechsteiner M. Ubiquitin-lysozyme conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates. *J Biol Chem*, 1986, 261:2400~2408
- [12] Hough R, Pratt G, Rechsteiner M. Purification of two high molecular mass proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem*, 1987,262:8303~8313
- [13] Hershko A, Ciechanover A, Rose IA. Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: A component that interacts with ATP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979,76:3107~3110
- [14] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science, 2002. 358
- [15] Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J*, 1998,17:7151~7160

## DISCOVERING A CELLULAR PATHWAY ON ENERGY-CONSUMING PROTEIN DEGRADATION—THE STORY BEHIND THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2004

CHANG Zeng-yi<sup>1</sup>, JIAO Wang-wang<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China;

2. Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract:** The Nobel Prize in Chemistry for 2004 was awarded to Aaron Ciechanover, Avram Hershko and Irwin Rose, for their discovery of the ubiquitin-mediated protein degradation (proteolysis). Their discoveries are reviewed here in a historical perspective. Lessons that might be learned from their experiences are discussed.

**Key Words:** 2004 Nobel Prize in Chemistry; Energy-dependent proteolysis; Intracellular proteolysis; Ubiquitin