

· 综述 ·

DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2018.12.03

蛋白质赖氨酸残基的琥珀酰化修饰

李 蓉, 陈雪岚*

(江西师范大学生命科学学院, 南昌 330096)

摘要 蛋白质的琥珀酰化修饰是一种普遍存在于真核生物和原核生物中的翻译后修饰。修饰的蛋白质遍及细胞膜、细胞质基质、各种细胞器及细胞核等细胞的各个部分,它们参与了细胞内包括糖代谢、三羧酸循环和脂肪酸代谢等各种代谢反应,与生命体的活动息息相关。本文综述了琥珀酰化蛋白质活性变化、修饰位点周围氨基酸的特异性及空间结构的分析、亚细胞分布情况、琥珀酰化与乙酰化之间的相互作用及碳源和生长阶段对蛋白质琥珀酰化水平的影响等内容,以期为后续蛋白质的琥珀酰化科研提供一定的参考。

关键词 赖氨酸琥珀酰化; 去琥珀酰化; 翻译后修饰; 乙酰化作用

中图分类号 Q51

Succinylation Modification of Lysine Residues of Proteins

LI Rong, CHEN Xue-Lan*

(College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330096, China)

Abstract Succinylation modification of proteins is a common post-translational modification in eukaryotes and prokaryotes. Modified proteins localize to cell membranes, cytoplasm, organelles and nuclei, and participate in various metabolic reactions, including glucose metabolism, tricarboxylic acid cycling, and fatty acid metabolism, which is closely related to the activities of life. In this paper, the changes of succinylated protein activity, the specificity of amino acids around the modified site, the spatial structure and the subcellular distribution were reviewed. The interaction between succinylation and acetylation, and the influence of carbon source and growth stage on the level of succinylation of proteins were discussed in order to provide some reference for further study on succinylation of proteins.

Key words lysine succinylation; desuccinylation; post-translational modification (PTM); acetylation

随着人们对生命体各种代谢通路研究的逐步深入,发现代谢途径中参与催化各种反应的酶量和酶活性不仅能决定代谢通量的大小,还能改变代谢通量的去向。因此,研究者可以根据自身需求,通过改变代谢酶的活性,优化所需机体的生长或获取更多的代谢产物。但越来越多的证据表明,无论是在细菌还是真核生物中,酶浓度的变化不足以解释代谢流方向的改变。对酶的变构修饰的研究,可能会揭示其作为改变代谢酶和代谢通量的一种重要的调控方式^[1]。翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)是其中一类有效的蛋白质修饰方式。翻译后修饰普遍存在于各种原核生物和真核生物中,并在各种生命活动过程中发挥重要的作用。在构成蛋白质的 20 种氨基酸中,赖氨酸位点发生翻译后修饰最为频繁。常见的有乙酰化、丙酰化、丁酰化、丙二酰化和琥珀酰

化等修饰^[2-4]。其中,迄今为止研究得较为清楚的是赖氨酸位点的乙酰化修饰。研究结果表明,蛋白质中赖氨酸残基的乙酰化修饰作用参与了细胞多层

收稿日期: 2018-04-16; 修回日期: 2018-05-27; 接受日期: 2018-09-01
国家自然科学基金(No. 31660019); 江西省“5511”优势科技创新团队项目(No. 20165BCB19004)和江西省自然科学基金(No. 2016BAB204173)资助

* 通讯作者 Tel: 13330093162; E-mail: xuelanchen162@163.com
Received: April 16, 2018; Revised: May 27, 2018; Accepted: September 1, 2018

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 31660019); “5511” Advantageous Science and Technology Innovation Team Project of Jiangxi Province (No. 20165BCB19004) and Jiangxi Natural Science Foundation of China(No. 2016BAB204173)

* Corresponding author Tel: 13330093162; E-mail: xuelanchen162@163.com

面的生命活动,包括碳代谢、转录调控、氨基酸代谢等^[5,6]。而近年有关赖氨酸琥珀酰化(lysine succinylation, Kcuss)修饰与乙酰化(lysine acetylation, KAc)修饰高度重合的现象逐渐被关注。Weinert 等^[7]用液相色谱质谱串联(LC-MS/MS)法鉴定大肠杆菌(*Escherichia coli*)、酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)、人类宫颈癌细胞(HeLa)和小鼠肝细胞的琥珀酰化位点时发现,发生了 Kcuss 修饰的部分赖氨酸位点同时也发生乙酰化修饰。它们在以上 4 种机体中的重合率分别是 66%、56%、27% 和 57%; Mizuno 等^[6]在谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)中检测到两者的重合率为 40%; Kosono 等^[1]用质谱法和稳定同位素标记(stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC)等方法,发现枯草芽孢杆菌中这两种修饰的重叠率为 35%; Kcuss 程度整体较高的线粒体中,1 190 个琥珀酰化位点就有 939 个位点,同时也发生了乙酰化修饰^[8]。因此,蛋白质赖氨酸残基的琥珀酰化修饰作用也引起相关科研工作者的兴趣。本文从琥珀酰化修饰的发现、琥珀酰化和脱琥珀酰化修饰、修饰位点周围特异性序列及空间结构的分析、亚细胞分布情况、Kcuss 与 KAc 之间的相互作用以及碳源和生长阶段对蛋白质琥珀酰化水平的影响等几方面进行概述,以期后续蛋白质琥珀酰化修饰的研究提供一定的参考。

1 蛋白质赖氨酸残基琥珀酰化修饰的发现

目前已知的翻译后修饰已有 400 种以上,其中最为常见的如磷酸化、甲基化、乙酰化、琥珀酰化、泛素化修饰,它们在组蛋白或非组蛋白上均有发现^[9-12]。而 Kcuss 修饰是在细菌的非组蛋白中最早被鉴定出的一种修饰^[13]。

2004 年, Rosen 等^[14]在研究大肠杆菌中参与蛋氨酸合成第一步的高丝氨酸转琥珀酰酶(homoserine trans-succinylase, HTS)时,发现在 45 位和 46 位上的赖氨酸有约 100 左右的质量变化。经高效液相色谱、质谱等方法证实,为 Kcuss 修饰导致分子质量发生了变化。至此,蛋白质赖氨酸残基琥珀酰化修饰开始进入人们的视野。

2 蛋白质赖氨酸残基琥珀酰化与脱琥珀酰化修饰作用

2.1 蛋白质赖氨酸残基的琥珀酰化修饰作用

在 Kurmi 等^[15]的发现之前,有关蛋白质的

Kcuss 修饰作用机制认为,可能是琥珀酰-CoA 与暴露的赖氨酸残基发生了非酶催化结合,使二者在赖氨酸 ϵ 位氨基发生共价连接^[2, 16, 17]。该修饰将带负电荷的羧基加入到被修饰位点处,中和其所带正电荷^[7, 18],从而影响赖氨酸与周围氨基酸之间的相互作用,进而影响蛋白质的空间结构,最终导致蛋白质活性的改变。发生琥珀酰化的琥珀酰基供体推测为三羧酸循环的中间代谢物琥珀酰辅酶 A。这两方面的证据支持,一是琥珀酰化程度能随着琥珀酰辅酶 A 浓度的增加而呈现上升趋势^[7];二是在体外研究 α -酮戊二酸脱氢酶复合体(α -oxoglutarate dehydrogenase complex, ODHc)与抑制物 OdhI 之间的相互作用时,发现琥珀酰化修饰过程中琥珀酰辅酶 A 的浓度与其琥珀酰化程度亦呈正相关^[6]。该试验不仅提供了证据表明,琥珀酰辅酶 A 是琥珀酰化的酰基供体,而且验证了该修饰过程是非酶催化的。

2018 年, Kurmi 等^[15]研究发现,肉碱棕榈酰转移酶 1 A(carnitine palmitoyltransferase 1 A, CPT1A)除了具有催化长链酰基-CoA 产生长链酰基肉碱和肉碱的酶活性外,还具有以琥珀酰-CoA 为底物,催化蛋白质的赖氨酸残基发生琥珀酰化修饰的赖氨酸琥珀酰化转移酶(lysine succinyltransferase, LSTase)活性。无论是在体外还是体内,该酶都能在琥珀酰-CoA 含量不变的情况下,提高细胞内蛋白质的琥珀酰化水平,说明琥珀酰化修饰可以在酶的催化作用下发生,且该科研团队鉴定了约 100 种蛋白质的赖氨酸琥珀酰化修饰是依赖于该酶的催化。这填补了人们对琥珀酰化修饰作用机制认识的空缺。

综上所述,蛋白质赖氨酸琥珀酰化修饰的催化机制存在酶催化和非酶催化这两种机制。

2.2 蛋白质赖氨酸残基的脱琥珀酰化修饰作用

KAc 是通过相应的酰基转移酶和脱酰基酶可逆地在蛋白质赖氨酸残基上添加或剥离酰基基团,从而实现动态调控各种蛋白质活性。关于蛋白质的脱酰化现象,研究得相对较多的是在真核生物中。沉默信息调节因子(silent information regulator 2, Sir2)是一类 NAD⁺依赖性的调控因子家族^[19, 20]。在真核生物线粒体中, Sir2 家族共有 7 个成员,其中 Sirt1、Sirt2、Sirt3 有很强的去乙酰化活性,能脱除大部分蛋白质的乙酰化修饰,而 Sirt 4~7 几乎检测不到类似的作用,即使同时敲除也不会对 KAc 水平产生太大的影响^[9, 21]。但当 Sirt5 被敲除后,核蛋白体中 H2A、H2B、H3、H1 的赖氨酸琥珀酰化程度会

上升^[2];小鼠氨甲酰磷酸合成酶 1 (carbamoyl phosphate synthetase 1, CPS1) 赖氨酸琥珀酰化 (Kcuss) 程度升高。在总蛋白质量不变的前提下,其活性却比未敲除株降低了 15%^[21, 22];丙酮酸脱氢酶复合体 (pyruvate dehydrogenase complex, PDC) 由 E1 α 、E1 β 、E2、E3 和 E3bp 几个亚基组成,当 Δ Sirt5 时各亚基都有超赖氨酸琥珀酰化现象,且酶活性上升;呼吸链中的复合酶体 II (succinate dehydrogenase, SDH) 在同条件下赖氨酸琥珀酰化也呈上升状态;但当 Sirt5 存在时,丙酮酸脱氢酶复合体 (PDC) 和呼吸链中的复合酶体 II 的酶活性受到抑制, Sirt5 对 PDC 和 SDH 的负调控会导致线粒体呼吸作用受到抑制^[2];在对家鼠整体赖氨酸琥珀酰化水平探究过程中也发现, Δ Sirt5 实验组中, 90% 以上的赖氨酸位点会出现赖氨酸琥珀酰化修饰程度上升现象^[2]。以上结果表明, Sirt5 具有脱琥珀酰化酶活, 能催化脱除赖氨酸上琥珀酰基, 从而调控相应的蛋白酶活性。此外, 有研究表明, SIRT5 脱琥珀酰化的靶点主要集中在 β -氧化、支链氨基酸代谢、TCA 循环、ATP 合成、酮体生成以及丙酰基-CoA 代谢途径上, 这些都是能量代谢网络的关键节点^[8]。上述结果暗示, SIRT5 的脱琥珀酰化作用在机体能量代谢中发挥了关键作用。

通过质谱分析 Sirt5 的脱琥珀酰化作用机制, 发现与其家族成员脱乙酰化相似。它有 1 个酰基绑定区域, 此区域不仅能催化赖氨酸残基去琥珀酰化, 同时还具有去丙二酰化酶活性。Sirt5 晶体结构显示, 在它的催化区域内 102 位的酪氨酸和 105 位的精氨酸, 无论是在低等生物还是高等生物中都是保守的。若将两者突变为其他氨基酸, 则该酶的去琥珀酰化活性下降^[13, 23]。表明这两个保守的氨基酸残基与其脱琥珀酰化能力密切相关。另外, Sirt7 也被鉴定出具有脱琥珀酰化活性, 它能脱去组蛋白 H3 中 K122 位上的琥珀酰基, 且这一反应与细胞中 DNA 损伤修复和染色质的松弛状态有关。无论是在非同源末端修复还是同源重组修复中, Sirt7 介导的组蛋白 H3 的脱琥珀酰化都是参与初期修复的必要步骤;而该位的去琥珀酰化, 也能影响染色体的固缩, 增强核小体中蛋白质和 DNA 之间的稳定性^[24]。

CobB 是原核生物 *E. coli* 中唯一已知的脱乙酰化酶, 在结构上有与 Sirt5 相似的酰基绑定区域。将其敲除后, 菌株的 KAs 和赖氨酸琥珀酰化在一定程度上都有所提高, 推测其可能也具有脱琥珀酰化能力^[7]。结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)

中, 在 NAD^+ 存在条件下, CobB 能脱去乙酰辅酶 A 合成酶的琥珀酰基, 同样体现出它的双功能^[25];在对 CobB 进行体外动力学参数测定时发现, 它确实具有脱乙酰化和脱琥珀酰化的双功能, 且活力相似;但如果将其 92 位酪氨酸突变成苯丙氨酸, 或将 95 位精氨酸突变成甲硫氨酸后, 脱乙酰化酶活性均下降约 3 倍, 脱琥珀酰化酶活性则分别下降 42 倍和 100 倍, 这表明 CobB 脱琥珀酰化能力更强^[26]。

3 琥珀酰化修饰位点的特异性序列及空间结构分析

以赖氨酸残基为修饰氨基酸的翻译后修饰有许多种, 是否每个赖氨酸残基都可以发生多种修饰, 还是每种修饰方式修饰的赖氨酸残基都有独特的特点, 至今仍未有相关报道。所以, 以发生酰化修饰的赖氨酸残基为中心, 监测周围氨基酸出现的频次, 以判断各生物体发生这种修饰是否有氨基酸序列偏好性, 是解释以上问题的途径之一。

研究者通常以发生修饰的赖氨酸位点为原点, 监测其前后 10 个左右的氨基酸残基出现频率, 以其作为后期深入研究的一个参考。Park 等^[2]研究琥珀酰化赖氨酸残基周围氨基酸偏好性, 发现在小鼠肝和胚胎纤维母细胞中, 甘氨酸和丙氨酸常出现在修饰位点的 -1 位, 丙氨酸亦常出现在 +1 位, 其中 AK、GK、KF 和 KA 是出现频率最高的氨基酸组合; Weinert 等^[7]在对真核生物 *S. cerevisiae*、HeLa 和小鼠肝赖氨酸琥珀酰化修饰研究中指出, 天冬氨酸、谷氨酸和赖氨酸多出现在 +1 位, 亮氨酸和丙氨酸出现在 -1 位;在水稻胚胎中, 谷氨酰胺、谷氨酸重复出现在 -1 位, 苏氨酸和缬氨酸多次出现在 +2 位^[14]。在结核分枝杆菌中^[25], 谷氨酸频繁出现在 -1 位和 +2 位, 天冬氨酸多出现在 -1 位, 赖氨酸常出现在 -6、-4 和 +5 位。上述结果表明, 无论在植物、动物还是微生物中, 围绕赖氨酸琥珀酰化修饰的赖氨酸周围的氨基酸, 并未显示出很强烈的偏好性。这可能暗示各物种的基质偏好性有所不同^[25], 也有可能是在多肽富集过程中, 所使用的抗体对氨基酸序列的偏好有所不同而导致结果存在差异^[7]。此外, 真菌属红色毛癣菌分生孢子阶段, EK 和 VK 是酰化保守序列, 而菌丝期则是以 KY、FK、LK 和 KL 为修饰保守序列, 这种生长阶段酰化基序特异性的不同, 与生长阶段不同, 催化产生赖氨酸琥珀酰化的酶所具有的特异性不同而导致这种差异^[27]。

翻译后修饰会对蛋白质的定位、二级结构的稳

定性以及所修饰蛋白酶活性造成一定的影响^[14]。要想清楚地了解它们发生的特点和机制并加以利用,需要研究者进一步以发生修饰的氨基酸位点开始,逐步深入了解蛋白质的多级结构,甚至上升到蛋白质之间的相互作用等相关领域,才能将发生琥珀酰化的赖氨酸残基在蛋白质中精确定位。He 等^[13]在对水稻胚芽赖氨酸琥珀酰化和 KAc 研究过程中发现,这两种修饰都更倾向于发生在 β 片层结构和 α 螺旋区域;在用 NetSurfp 算法对 *M. tuberculosis* 中赖氨酸琥珀酰化位点结构特点预测时发现,54.4% 琥珀酰化赖氨酸残基同样也位于 β 片层结构和 α 螺旋区域^[25];在对普通小麦中赖氨酸琥珀酰化蛋白质二级结构进行探究的过程中亦发现,所有位于规则二级结构域内的琥珀酰化位点也有 27.8% 位于 α 螺旋区域,6.5% 位于 β 片层结构中^[28]。总体而言,无论是在真核还是原核生物中,发生赖氨酸琥珀酰化修饰的赖氨酸出现在规律的二级结构中,且发生赖氨酸琥珀酰化的赖氨酸多暴露在蛋白质表面。KAc 和赖氨酸琥珀酰化两种修饰重合的位点亦多位于极性的、或酸或碱的氨基酸区域,并暴露在蛋白质表面^[14, 25]。研究结果表明,酰化修饰可能会通过改变蛋白质结构而影响到所修饰蛋白质的性能。

4 琥珀酰化修饰蛋白质的亚细胞分布

蛋白质亚细胞结构的定位可辅助判定该蛋白质的功能。所以,在还未清楚这种修饰发生的机制以及其对不同蛋白质功能的影响时,全方位探知它的相关知识是非常重要的,同时也能为后期研究各亚细胞结构中赖氨酸琥珀酰化蛋白质的相互作用提供参考。

从大量有关蛋白质赖氨酸琥珀酰化的研究报道中可以看出,这种蛋白质的翻译后修饰,遍布各种动物、植物和微生物中,并参与各种代谢路径的各种蛋白质的修饰。Weinert 等^[7]通过绿色荧光蛋白标记,获得人和小鼠肌肉细胞中的赖氨酸琥珀酰化蛋白质,利用 Uniprot 数据库,将它们分别定位到线粒体、细胞质基质和细胞核中,人细胞赖氨酸琥珀酰化蛋白质在这 3 大区域的占比分别为 38%、38% 和 24%;小鼠肌肉则分别为 64%、30% 和 6%。Park 等^[2]研究表明,小鼠肝线粒体中有 23% 赖氨酸琥珀酰化蛋白质;小鼠胚胎纤维母细胞线粒体中也有 16% 赖氨酸琥珀酰化蛋白质的存在。动物细胞中,这种线粒体蛋白质赖氨酸琥珀酰化水平会出现相对

较高的现象,可能因为它是三羧酸循环和奇数脂肪酸氧化的场所,这两种代谢是琥珀酰辅酶 A 的重要来源。

在植物细胞中,也不乏赖氨酸琥珀酰化修饰的身影。对番茄赖氨酸琥珀酰化蛋白质进行定位显示,线粒体赖氨酸琥珀酰化蛋白质占发生这种修饰的总蛋白质的 40%,细胞质基质中占比 45%,细胞核中也有 15% 的比例^[29]。Feng 等对铁皮石斛赖氨酸琥珀酰化蛋白质进行定位处理,结果显示,线粒体、细胞质基质和细胞核中的百分含量分别为 9%、38% 和 7%,叶绿体中的占比也达到了 38% 的高水平^[29];在小麦中,以上 3 大区域赖氨酸琥珀酰化蛋白百分含量分别为 12.1%、35.8% 和 6.9%,而叶绿体中达到了 35.8% 的高百分比^[28]。植物主要是通过光合作用提供能量供给正常的生命活动,相应场所叶绿体中琥珀酰蛋白质的含量较高。这表明,植物中参与能量代谢的蛋白质可能普遍存在赖氨酸琥珀酰化作用。

自 *E. coli* 中首次发现赖氨酸位点的赖氨酸琥珀酰化以来,其他微生物中同种修饰也逐渐受到关注。2013 年,Weinert 等在监测真核细胞赖氨酸琥珀酰化时,发现酵母的线粒体中仅有 8% 的赖氨酸琥珀酰化蛋白质存在^[7]。2015 年,Yang 等^[25]在对 *M. tuberculosis* 中赖氨酸琥珀酰化蛋白质组进行分析时发现,除了细胞质基质中赖氨酸琥珀酰化蛋白质占有 74.4% 的绝对高比例外,还发现细胞膜上含 11.98%,0.48% 位于细胞壁上,0.8% 的赖氨酸琥珀酰化蛋白是分泌到胞外的蛋白质,后 3 者在决定分枝杆菌毒性时可能起着重要作用,而大部分的赖氨酸琥珀酰化蛋白质则与其生长有关。虽然目前微生物赖氨酸琥珀酰化的相关报道较少,但从已有的研究结果显示,赖氨酸琥珀酰化与 KAc 等其他翻译后修饰一样,它们不仅影响着微生物的正常生长,还与致病性微生物的病原性有相关性。

5 代谢路径中蛋白质的琥珀酰化修饰

使用 GO 和 KEGG 数据库,对各生物体内能检测到的赖氨酸琥珀酰化蛋白进行富集分析显示,鼠细胞中修饰蛋白质多集中在酮酸代谢、氧化还原反应、辅酶代谢、翻译过程等几大方面。其中,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解途径的 51 个蛋白质中就有 37 个出现赖氨酸琥珀酰化,参与三羧酸循环和脂肪酸代谢的蛋白质中也分别有 80% 和 60% 发生了赖氨酸琥珀酰化^[2];萌发的水稻胚芽中鉴定出的 261

个赖氨酸琥珀酰化蛋白质大多数参与应激反应、翻译和糖代谢。其中,136 个赖氨酸琥珀酰化蛋白质涉及了糖酵解/糖异生、丙酮酸代谢、三羧酸循环和碳的固定^[13];普通小麦中也主要涉及 TCA 循环、碳固定和糖代谢,还有一部分参与了光合作用^[28];结核分枝杆菌的 616 个赖氨酸琥珀酰化蛋白质,多集中在酮体代谢、羧酸代谢、酮酸代谢和有机酸代谢。KEGG 进一步富集分析,大部分蛋白质涉及核糖体、三羧酸循环、脂肪酸代谢、糖酵解、糖异生、丙酮酸代谢、氧化磷酸化、乙醛酸和二羧酸代谢^[25];枯草芽孢杆菌的 204 个赖氨酸琥珀酰化蛋白质中,17% 参与翻译过程,14% 参与糖代谢,涉及氨基酸代谢的也有 11%。用 Cytoscape 制作 *M. tuberculosis* 蛋白质互作网络图中,有 462 个赖氨酸琥珀酰化,它们涉及该菌的特殊的蛋白质分泌系统、毒性、适应性等功能^[1];红色毛癣菌中,基于 GO 富集,主要涉及小分子代谢、酮酸代谢、羧酸代谢、有机酸代谢。KEGG 富集分析显示,涉及 TCA、碳代谢、氧化磷酸化、糖酵解/糖异生^[27]。

以上所展示的只是生物体内大部分赖氨酸琥珀酰化蛋白集中富集的代谢路径。事实上,几乎每个代谢过程都有或多或少的蛋白质发生了赖氨酸琥珀酰化,说明赖氨酸琥珀酰化在细胞中扮演重要的角色。

6 琥珀酰化和乙酰化修饰的相互作用

翻译后修饰既然调控着无数的生物过程,对于了解细胞的调控机制来说,检测它们的多样性很关键,检测它们之间的相互作用也同样重要^[30]。早在 2007 年,Witze 等就提出,探索以同一个残基为目标的不同化学反应之间的层级或相互控制的关系,是未来非常重要的一个领域^[30]。如 *O*-连接的 *N*-乙酰葡萄糖胺 *O* 的乙酰化,会预先阻断丝氨酸和苏氨酸残基上将要发生的磷酸化,连带影响随后进行的赖氨酸位点的泛素化,使蛋白质不被降解并使调控蛋白质具有良好的稳定性^[31, 32]。赖氨酸琥珀酰化也可能和其他翻译后修饰共同影响代谢路径中蛋白质的结构和功能。蛋白质的这种修饰和乙酰化修饰都是以赖氨酸为修饰位点,且参与琥珀酰辅酶 A 和乙酰辅酶 A 合成的酶,多有互为酰化修饰的情况^[33]。如乙酰辅酶 A 合成酶 (acetyl-CoA synthetase, ACSase) 的 K193 和 K366 能发生赖氨酸琥珀酰化。将其突变成精氨酸后,该酶活性会显著提升^[25]。此外,无论是真核生物还是原核生物,虽然其大部分的

修饰位点是独立的,但同时修饰同一位点的现象也很常见。这些现象表明,这两种修饰方式可能共同影响蛋白质的性能。发生在同一位点上的两种修饰存在两种合理的情况,第一种类似于 *O*-连接的 *N*-乙酰葡萄糖胺上的乙酰化或磷酸化是竞争关系;另一种类似发生在真核生物组蛋白中的翻译后修饰。同一位点的两种修饰有着不同的生理功能^[26]。对于赖氨酸琥珀酰化和 KAc 之间的关系,是竞争或是独立发生作用,亦或是相辅相成,目前情况仍尚未明朗。因此,从多方面探索两者之间的关系,无论是对自身结构还是对蛋白质修饰的差异研究都是必要的。

就酰基供体本身而言,乙酰辅酶 A 有两个酰基碳,生理 pH 条件下不带电;琥珀酰辅酶 A 有 4 个酰基碳,生理 pH 下带负电荷,且它们的末端羧酸不同。在这两种修饰的非酶催化过程中,乙酰化多倾向于在碱性 pH 条件下发生,范围较窄。这是它多发生在线粒体中的原因;而赖氨酸琥珀酰化则是在酸性与碱性条件下都能发生,对 pH 的依赖性较低^[34]。体外模拟实验显示,在同等条件下,蛋白质的赖氨酸琥珀酰化程度要比 KAc 程度高,这与琥珀酰辅酶 A 发生了一种化学现象,即分子内的一般碱催化有关,这种催化在羧酸酯和酰基-羰基碳靠近时,会促进亲核攻击和自身水解的发生。该过程使琥珀酰辅酶 A 自身水解,产生辅酶 A 和高能量的环形酸酐,这种酸酐会与赖氨酸的 ϵ 氨基发生剧烈的反应,形成赖氨酸的赖氨酸琥珀酰化修饰^[34]。此外,琥珀酰基的加入会使蛋白质的电荷有 +1 到 -1 的变化。这种变化会对所修饰蛋白质结构带来更显著的改变,从而对其相应的功能产生更深远的影响^[26, 27]。

7 影响琥珀酰化修饰的因素

在对各种翻译后修饰研究的过程中发现,修饰蛋白质充斥在整个细胞的各种代谢中。其中,修饰程度最高的蛋白质多集中在碳代谢、三羧酸循环、脂肪酸氧化等中心代谢流内,参与各代谢过程的催化^[27]。

在研究蛋白质 KAc 作用时就发现,当生物体糖酵解发生较快时,去乙酰化酶活性会降低,KAc 水平会升高。所以,存在这样的猜想,即 KAc 可能是一种能量储存的方式。当培养基营养成分充足时,参与糖酵解的蛋白质被 KAc 激活,糖酵解加速,而其他代谢路径的酶的 KAc 会降低;当营养条件不佳

时, NAD^+/NADH 的比值上升, 糖酵解相关酶去乙酰化, 活性受到抑制, 其他路径则相反^[18]。所以, 是否修饰位点相似的赖氨酸琥珀酰化在对蛋白质进行修饰时, 也存在与细胞生长阶段、生长条件相关的情况? 这一问题值得探究。

7.1 碳源对琥珀酰化修饰的影响

研究者发现 *E. coli* 蛋白质赖氨酸残基有 2 580 个发生了琥珀酰化修饰, 2 803 个发生了乙酰化修饰。高葡萄糖浓度培养条件下, 两种修饰的检测率分别为 85% 和 63%; 基本培养基培养时分别为 0.6% 和 3.1%; 两种培养条件下都发生修饰的百分率分别为 14% 和 33.5%。以上数据表明, 葡萄糖浓度对琥珀酰化的动态影响比乙酰化更大^[26]。

当酵母细胞生长在以葡萄糖或半乳糖做碳源的培养基中时, 与葡萄糖相比, 若半乳糖做唯一碳源, 细胞的赖氨酸琥珀酰化程度整体上升 1.7 倍, 线粒体中则上升 2.7 倍到 4.7 倍。这是因为三羧酸循环酶 ODHC 的 Kgd1 亚基能被半乳糖诱导表达。当该基因被敲除时, 整体赖氨酸琥珀酰化程度下降 4 倍之多, 线粒体中下降更多; 当下游编码琥珀酰辅酶 A 连接酶亚基基因 *lsc1* 被敲除, 阻断琥珀酰辅酶 A 进一步代谢产生下游产物, 整体赖氨酸琥珀酰化程度会上升 3 倍^[7]。正如上文所述, 赖氨酸琥珀酰化修饰是由琥珀酰辅酶 A 提供酰基, 而乳糖在此处就是通过提高琥珀酰辅酶 A 的浓度来提高整体赖氨酸琥珀酰化水平的。在不同碳源存在时, 对枯草芽孢杆菌酰化修饰的研究中发现, 以葡萄糖作为唯一碳源时, 赖氨酸琥珀酰化修饰多出现在核糖体中, 且中心碳代谢 KAc 程度高于赖氨酸琥珀酰化; 当以柠檬酸作为碳源时, 赖氨酸琥珀酰化蛋白质多数富集在核糖体、三羧酸循环和氨酰-tRNA 生物合成中, 且中心碳代谢的赖氨酸琥珀酰化程度更高^[1], 这可能也与琥珀酰辅酶 A 浓度相关。以上结果表明, 不同的碳源对赖氨酸琥珀酰化程度有显著影响, 且不同的碳源可能是影响细胞不同区域琥珀酰化水平不同的原因。

7.2 生长阶段对琥珀酰化修饰的影响

除了碳源对蛋白质的赖氨酸琥珀酰化存在明显的影响之外, 机体所处的生产状态和生长状态也对其存在一定的影响。

C. glutamicum 在含有 Tween 40 的培养基中会以 α -酮戊二酸为前体, 生产谷氨酸。当该菌处在谷氨酸非生产状态时, 细胞整体的 KAc 水平逐渐上升, 直到培养基中葡萄糖消耗殆尽, 细胞生长进入稳

定期时达到最大化; 相反, 当该菌处在生产状态时, 赖氨酸琥珀酰化水平整体提高^[6]。

皮肤真菌是一种丝状真菌, 主要有分生孢子和菌丝体两个生长阶段。LC-MS/MS 分析在这两个不同阶段时, 发现 284 种蛋白质检测到 569 个赖氨酸琥珀酰化位点, 其中 37% 出现在分生孢子阶段, 菌丝体阶段则占比 76%。这可能是由于分生孢子阶段属于菌体休眠阶段, 代谢相对不活跃所引起。虽然在两个生长阶段下, 赖氨酸琥珀酰化程度明显不同, 但大部分赖氨酸琥珀酰化蛋白质在主要的代谢分类中百分含量是相似的^[27]。

7.3 哺乳动物琥珀酰化修饰变化

小鼠处在饥饿和非饥饿两种状态时, 检测它们肝和肾线粒体赖氨酸琥珀酰化的变化情况。发现在饥饿状态下, 两种组织中的赖氨酸琥珀酰化程度上升, 且肝中的上升更明显^[2]。鼠肝细胞在缺乏葡萄糖条件下培养 24 h 后, 由于需要酮体为肝外组织如心、大脑等供能, 细胞的脂肪酸 β -氧化会上升; 但若 Sirt5 缺乏, 蛋白质琥珀酰化水平的上升会使其依旧保持较低的代谢状态^[8]。这些结果表明, 琥珀酰化可能承担着回应细胞能量状态的重责。

到目前为止, 哺乳动物琥珀酰化相关研究仍比较少, 但影响哺乳动物琥珀酰化水平的因素必然包括 CPT1A 和其他未知琥珀酰转移酶活性, 包括 Sirt5 和其他未知的脱琥珀酰化酶活性与酰基供体乙酰辅酶 A 及 NAD^+ 的水平。对不同情况下哺乳动物中琥珀酰化的变化进行检测, 可以增加赖氨酸琥珀酰化对调控蛋白质功能的理解。尤其对人体而言, 由于多种病原菌如结核分枝杆菌的蛋白质琥珀酰化能影响其毒性和感染性, 是否人体本身的蛋白质琥珀酰化也会改变其遭受病原体感染的难易程度或是抵抗力, 仍需进一步的研究。

8 琥珀酰化修饰对蛋白质功能的影响

酶蛋白的活性中心具有结合底物并催化形成产物, 是酶发挥正常催化功能所必须的。Park 等^[2]通过与数据库 UniProt 的注解相比, 发现检测到的蛋白质琥珀酰化位点中, 16 个琥珀酰化位点出现在辅因子绑定区或酶催化区, 74 个琥珀酰化位点存在于酶活性位点周围。这暗示, 蛋白质赖氨酸残基的琥珀酰化参与酶的催化功能。

正如上文所述, Sirt5 的存在, 会通过降低赖氨酸琥珀酰化的方式抑制丙酮酸脱氢酶复合体和呼吸链中的复合酶体 II (SDH) 的酶活性。这也表明, 赖

氨酸琥珀酰化会影响这两种酶的活性。丙酮酸脱氢酶复合体活性的紊乱与人类二型糖尿病及其他的疾病相关,而与之活性相关的琥珀酰化修饰,可能会提供另一种药物靶点研究方向。异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH)能催化异柠檬酸形成 α -酮戊二酸,其琥珀酰化位点 K199 和 K242 的突变会降低其活性^[35];人肿瘤中与之同源的异柠檬酸脱氢酶 2 发生突变,催化产生的则是 D-2-羟戊二酸^[36]。该酶 5 个催化必须位点中有 2 个被鉴定为琥珀酰化修饰位点^[2]。这可能暗示,催化位点的琥珀酰化与催化产物发生改变之间有某种联系;293T 细胞表达正常的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),其细胞内的活性氧成分下降 19%;若对其 K123 位点做去琥珀酰化处理,细胞内的活性氧成分则下降 43%,即琥珀酰化抑制了 SOD 酶活性并影响其功能;反之,它去除细胞活性氧的能力会提升^[37]。小鼠酮体合成限速酶 3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA 合酶 2 的琥珀酰化会修饰其底物绑定区域,使之酶活性受到负调控,最终导致酮体的产生受阻^[8]。丙酮酸激酶 PKM2 担任着糖酵解的限速酶功能,其 K498 的琥珀酰化会影响肿瘤细胞的 ROS 水平^[38]。已有研究表明,PKM2 的活性和功能受多种翻译后翻译修饰的调控,已检出的 7 个琥珀酰化位点中,K311 的琥珀酰化会促使 PKM2 二聚体形式形成,并抑制其四聚体形式,即能提高其将组蛋白 H3 的 T11 磷酸化的蛋白激酶活性,抑制其以磷酸烯醇式丙酮酸为底物的催化活性。脂多糖激活的巨噬细胞中,PKM2 能与 HIF1 α 共同作用,调控白细胞介素 IL-1 β 的水平。它的琥珀酰化会促进 IL-1 β 和其它促炎症细胞因子产生,这会提升炎症性肠病的易感性^[39]。

总之,琥珀酰化调控各代谢路径,并通过可逆地修饰各种酶,从而动态改变各种酶的酶活性,以达到根据机体自身需求来调控各种代谢的目的。机体 ROS 水平与多种疾病相关,且肿瘤细胞或巨噬细胞中琥珀酰化的发现,也充分说明这种翻译后修饰方式与机体的各种疾病,以及免疫系统的正常功能存在必然的联系。

9 问题与展望

本文从多方面综述了赖氨酸琥珀酰化相关的研究进程。这种翻译后修饰主要发生在赖氨酸残基上,能使修饰后的蛋白质由正电荷变为负电荷状态,导致蛋白质结构发生较大的变化。这一变化影响着

蛋白质的活性和空间构象。从现已报道的研究表明,无论是在动物、植物还是微生物中,蛋白质的赖氨酸琥珀酰化是非常常见的一种修饰。它涉及到生物体的几乎所有代谢路径,遍及细胞的各个部分,与细胞的生命活动息息相关。然而,有关研究依然不透彻,存在着许多问题需要进一步探究,如是否这些发生了同种修饰的蛋白质,在某些层面上,通过信号传导或者是其他未知的更精细的调控路径,将不同代谢路径,不同反应部位的生命活动联系起来,共同发生着更精细更严密的调控功能?蛋白质的赖氨酸位点的琥珀酰化与 KAc 修饰有所重叠,这种重叠是否为单独发生作用或是存在竞争关系,亦或是在某些条件下能相辅相成,共同促进某种调控作用?蛋白质的赖氨酸位点的琥珀酰化与现有的其他翻译后修饰之间有着怎样的关联,发生这些修饰的蛋白质集群生理上的相互作用是否有助于合作,或协调它们在各种信号和调控路径中的功能等问题都有待于科研工作者进一步揭示。

参考文献 (References)

- [1] Kosono S, Tamura M, Suzuki S, *et al.* Changes in the acetylome and succinylome of *Bacillus subtilis* in response to carbon source [J]. PLoS One, 2015, **10**(6): e0131169
- [2] Park J, Chen Y, Tishkoff DX, *et al.* SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways [J]. Mol Cell, 2013, **50**(6): 919-930
- [3] Colak G, Pougovkina O, Dai L, *et al.* Proteomic and biochemical studies of lysine malonylation suggest its malonic aciduria-associated regulatory role in mitochondrial function and fatty acid oxidation [J]. Mol Cell Proteomics, 2015, **14**(11): 3056-3071
- [4] Chen Y, Sprung R, Tang Y, *et al.* Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones [J]. Mol Cell Proteomics, 2007, **6**(5): 812-819
- [5] AbouElfetouh A, Kuhn ML, Hu LI, *et al.* The E. coli sirtuin CobB shows no preference for enzymatic and nonenzymatic lysine acetylation substrate sites [J]. Microbiologyopen, 2015, **4**(1): 66-83
- [6] Mizuno Y, Nagano S, Shoji M, Kubo S, *et al.* Altered acetylation and succinylation profiles in *Corynebacterium glutamicum* in response to conditions inducing glutamate overproduction [J]. Microbiologyopen, 2016, **5**(1): 152-173
- [7] Weinert BT, Schölz C, Wagner SA, *et al.* Lysine succinylation is a frequently occurring modification in prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation [J]. Cell Rep, 2013, **4**(4): 842-851
- [8] Rardin MJ, He W, Nishida Y, *et al.* SIRT5 regulates the mitochondrial lysine succinylome and metabolic networks [J]. Cell Metab, 2013, **18**(6): 920-933
- [9] Swatek KN, Komander D. Ubiquitin modifications [J]. Cell Res, 2016, **26**(4): 399-422
- [10] Finley D, Ulrich HD, Sommer T, *et al.* The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Genetics, 2012, **192**(2): 319-360
- [11] Guan BJ, Krokowski D, Majumder M, *et al.* Translational control during endoplasmic reticulum stress beyond phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α [J]. J Biol Chem, 2014, **289**(18): 12593-12611

- [12] Li KK, Luo C, Wang D, *et al.* Chemical and biochemical approaches in the study of histone methylation and demethylation [J]. *Med Res Rev*, 2012, **32**(4): 815-867
- [13] He D, Wang Q, Li M, *et al.* Global proteome analyses of lysine acetylation and succinylation reveal the widespread involvement of both modification in metabolism in the embryo of germinating rice seed [J]. *J Proteome Res*, 2016, **15**(3): 879-890
- [14] Rosen R, Becher D, Büttner K, *et al.* Probing the active site of homoserine trans-succinylase [J]. *FEBS Lett*, 2004, **577**(3): 386-392
- [15] Kurmi K, Hitosugi S, Wiese EK, *et al.* Carnitine palmitoyltransferase 1A has a lysine succinyltransferase activity [J]. *Cell Rep*, 2018, **22**(6): 1365-1373
- [16] Moellering RE, Cravatt BF. Functional lysine modification by an intrinsically reactive primary glycolytic metabolite [J]. *Science*, 2013, **341**(6145): 549-553
- [17] Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky A E. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1964, **51**: 786-794
- [18] Lin H, Su X, He B. Protein lysine acylation and cysteine succination by intermediates of energy metabolism [J]. *ACS Chem Biol*, 2012, **7**(6): 947-960
- [19] Fessel MR, Lira CB, Giorgio S, *et al.* Sir2-related protein 1 from *Leishmania amazonensis* is a glycosylated NAD⁺-dependent deacetylase [J]. *Parasitology*, 2011, **138**(10): 1245-1258
- [20] Tanner KG, Landry J, Sternglanz R, *et al.* Silent information regulator 2 family of NAD⁺-dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(26): 14178-14182
- [21] Du J, Zhou Y, Su X, *et al.* Sirt5 Is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase [J]. *Science*, 2011, **334**(6057): 806-809
- [22] Nakagawa T, Lomb DJ, Haigis MC, *et al.* SIRT5 deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle [J]. *Cell*, 2009, **137**(3): 560-570
- [23] He W, Newman JC, Wang MZ, *et al.* Mitochondrial sirtuins: regulators of protein acylation and metabolism [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2012, **23**(9): 467-476
- [24] Li L, Shi L, Yang S, *et al.* SIRT7 is a histone desuccinylase that functionally links to chromatin compaction and genome stability [J]. *Nat Commun*, 2016, **7**: 12235
- [25] Yang M, Wang Y, Chen Y, *et al.* Succinylome analysis reveals the involvement of lysine succinylation in metabolism in pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2015, **14**(4): 796-811
- [26] Colak G, Xie Z, Zhu AY, *et al.* Identification of lysine succinylation substrates and the succinylation regulatory enzyme CobB in *Escherichia coli* [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2013, **12**(12): 3509-3520
- [27] Xu X, Liu T, Yang J, *et al.* The first succinylome profile of *Trichophyton rubrum* reveals lysine succinylation on proteins involved in various key cellular processes [J]. *BMC Genomics*, 2017, **18**(1): 577
- [28] Zhang Y, Wang G, Song L, *et al.* Global analysis of protein lysine succinylation profiles in common wheat [J]. *BMC Genomics*, 2017, **18**(1): 309
- [29] Feng S, Jiao K, Guo H, *et al.* Succinyl-proteome profiling of *Dendrobium officinale*, an important traditional Chinese orchid herb, revealed involvement of succinylation in the glycolysis pathway [J]. *BMC Genomics*, 2017, **18**(1): 598
- [30] Witze ES, Old WM, Resing KA, *et al.* Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry [J]. *Nat Methods*, 2007, **4**(10): 798-806
- [31] Mukherjee S, Hao YH, Orth K. A newly discovered post-translational modification -the acetylation of serine and threonine residues [J]. *Trends Biochem Sci*, 2007, **32**(5): 210-216
- [32] Slawson C, Housley MP, Hart GW. O-GlcNAc cycling: how a single sugar post-translational modification is changing the way we think about signaling networks [J]. *J Cell Biochem*, 2006, **97**(1): 71-83
- [33] Zhao S, Xu W, Jiang W, *et al.* Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation [J]. *Science*, 2010, **327**(5968): 1000-1004
- [34] Wagner GR, Bhatt DP, O'Connell TM, *et al.* A class of reactive acyl-CoA Species Reveals the Non-enzymatic origins of protein acylation [J]. *Cell Metab*, 2017, **25**(4): 823-837
- [35] Mills E, O'Neill LA. Succinate: a metabolic signal in inflammation [J]. *Trends Cell Biol*, 2014, **24**(5): 313-320
- [36] Kranendijk M, Struys EA, van Schaftingen E, *et al.* IDH2 mutations in patients with D-2- hydroxyglutaric aciduria [J]. *Science*, 2010, **330**(6002): 336
- [37] Lin ZF, Xu HB, Wang JY, *et al.* SIRT5 desuccinylates and activates SOD1 to eliminate ROS [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, **441**(1): 191-195
- [38] Xiangyun Y, Xiaomin N, Linping G, *et al.* Desuccinylation of pyruvate kinase M2 by SIRT5 contributes to antioxidant response and tumor growth [J]. *Oncotarget*, 2017, **8**(4): 6984-6993
- [39] Wang F, Wang K, Xu W, *et al.* SIRT5 desuccinylates and activates pyruvate kinase M2 to block macrophage IL-1 β production and to prevent DSS-induced colitis in mice [J]. *Cell Rep*, 2017, **19**(11): 2331-2344