

前体蛋白转化酶家族的重要成员之一:弗林蛋白酶*

韩 明 杨 允 林宏宇 黄艺娜

(福建师范大学生命科学学院发育与神经生物学福建省高校重点实验室 福建 福州 350108)

摘要 弗林蛋白酶(Furin)是前体蛋白转化酶家族的重要成员之一,广泛存在于各种组织和细胞系中。Furin 经过两次自剪切去掉前肽后具有生理活性,能够识别特定的氨基酸序列并在 TGN 中对多种前体蛋白进行加工。Furin 的作用底物不仅包括神经肽和肽类激素,还包括许多生长因子、受体、血浆蛋白酶、基质金属蛋白酶及细菌外毒素等,具有重要的生物学功能。

关键词 弗林蛋白酶;内切蛋白酶;前体蛋白

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)18-3586-03

An Important Member of the Family of Proprotein Convertases: Furin*

HAN Ming, YANG Yun, LIN Hong-yu, HAUNG Yi-na

(Higher Education Laboratory of Development Biology and Neurobiology, College of Life Sciences, Fujian Normal University, 350108, Fuzhou, Fujian, People's Republic of China)

ABSTRACT: Furin is a key member of the family of proprotein convertases, which is expressed in all tissues and cell lines. It will gain its bioactivity after two self-cleavages and activate many other proproteins into their biologically active forms in the trans-Golgi network, because it can identify the specific amino acid sequence. Furin possesses important biological functions as it is capable of cleaving precursors of a wide variety of proteins, not only neuropeptides and peptide hormones, but also many growth factors, receptors, plasma proteases, matrix metalloproteinases and bacterial exotoxins.

Key words: Furin; Endoprotease; Proprotein

Chinese Library Classification: Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)18-3586-03

弗林蛋白酶(Furin)是真核生物细胞中一种重要的内切蛋白酶(endoprotease),负责许多前体蛋白的加工,对维持细胞内环境和许多疾病的发生起重要的作用。1986年, Roebroek^[1]发现了 furin 基因,因为该基因位于第15号染色体上的原癌基因 c-fes/fps 的上游,所以被命名为 fur 基因,并将其蛋白产物命名为 Furin,直到1989年, Fuller 等人^[2]发现 Furin 与酵母 Kexin 在催化结构域及附近区域都具有很高的同源性,证实 fur 基因编码的蛋白 Furin 是酵母 Kexin 的同源蛋白。1990年, Furin 被确认是一种成对的碱性氨基酸内切蛋白酶,能加工 β -神经生长因子前体分子形成成熟的 β -神经生长因子。Furin 蛋白的深入研究为进一步加深对前体蛋白转化酶家族的了解及研究酶的功能、前体蛋白的成熟机制、病毒和细菌的发病机制提供了重要的手段。

生物界中的许多蛋白质都是以前体分子的形式被合成的,前体分子由信号肽、前导肽、成熟肽三个部分组成。前体分子必须经过加工去除前导肽后才具有生理活性,而这一过程需要前体蛋白转化酶的参与。细菌枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)、酵母 Kexin、Furin 以及之后在各类真核细胞中发现的与 Furin 相类似的同源蛋白,都属于前体蛋白转换酶,他们的共同特征是对带有前导肽的前体蛋白进行切割,使其具有生物活性。Furin 是第一个被识别的前体蛋白转化酶,广泛存在于脊椎动物与无脊椎动物的细胞中,具有重要的生理作用。

1 结构特点

Furin 在拓扑结构上属于 Ⅱ型跨膜蛋白,由 794 个氨基酸组成,是丝氨酸枯草杆菌蛋白酶超家族中前体蛋白转化酶家族的成员之一。目前已知在哺乳类动物中此家族的前体蛋白转化酶有 7 种,分别是 Furin、PC2、PC1/PC3、PC4、PACE4、PC5/PC6、LPC/PC7/PC8/SPC7,除此之外还可以通过选择性剪切产生不同的亚型^[3]。Furin 属于镶嵌型蛋白,包含一系列多功能域,与其它成员在结构上具有很高的同源性。其 N 末端为一段信号肽区域(Signal peptide),可以指示不断增长的肽链在内质网和其分泌途径中的易位。与信号肽区域相邻的是前肽(Propeptide),前肽具有保守性,能抑制 Furin 处于非活性状态,并能引导 Furin 进行正确的折叠和活化。前肽的另一端与催化结构域(Catalytic domain)相连,催化结构域由大约 330 个高度保守的氨基酸组成,尤其是其活性位点处的 Asp、His、Ser 残基。催化结构域的 C 端是一个由大约 140 个氨基酸残基组成的结构域,被称为 Homo B 结构域、P 结构域或者中间结构域,主要参与调节催化结构域的活性^[4,5]。该结构域是一个保守区域,含有保守的 Arg-Gly-Asp 序列,在 PC1/PC3 中,三个氨基酸残基的任意一个发生突变都会导致其失去催化结构域的活性^[6]。除此之外, Furin 还含有一段富含半胱氨酸的区域,一个跨膜结构域和胞浆结构域。富含半胱氨酸的区域含有 Furin 折叠所需的结构信

* 基金项目 福建省自然科学基金资助项目(2009J01127)

作者简介 韩明(1985-)女,硕士研究生,主要研究方向:基因工程,

电话:13489994261 E-mail:liaojiehanming@126.com

(收稿日期 2011-10-27 接受日期 2011-11-23)

息^[7] 跨膜区域主要负责 Furin 在高尔基体外侧网络(trans-Golgi network ,TGN) 和细胞表面的定位,胞浆区域也与 Furin 在 TGN 上的定位有关,同时含有 Furin 被分选进入细胞内各组分所必须的信息^[8]。

2 Furin 的成熟和亚细胞定位

Furin 以无活性的前体形式被合成,Furin 前体由前肽和 Furin 两部分组成,通过蛋白水解去掉前肽形成具有生物活性的分子,该过程依赖于前肽的两次自我剪切。在中性环境的内质网中,前肽在靠近催化结构域的 Arg-Ala-Lys-Arg107↓ 位点发生第一次剪切,本次剪切过程十分迅速,但是被切下来的前肽并没有与 Furin 分离,而是与 Furin 结合在一起,以自身抑制剂的形式抑制 Furin 的活性^[9,10]。这一步是 Furin 前体蛋白离开内质网的前提条件。当前肽与 Furin 的复合体进入与 TGN 相类似的 pH 及高 Ca^{2+} 的环境时,Furin 将立即对前肽进行第二次剪切并释放前肽,作用位点是前肽内对酸性条件敏感的 Arg-Gly-Val-Thr-Lys-Arg75 序列。第二次剪切过程速度较慢^[10]。Furin 前体摆脱了前肽的抑制而成为成熟的 Furin 分子,并开始对其它前体蛋白进行加工使其成熟。

Furin 首先在内质网中合成 96 kDa 的前体分子,在信号肽的引导下进入内质网/高尔基体分泌途径。在 TGN 中前肽与 Furin 分离,Furin 被活化形成 81 kDa 的具有生理活性的分子。Furin 在表达稳定期,主要位于 TGN 上^[11],但是也有一部分 Furin 分子存在于细胞表面,有证据显示 Furin 可以在 TGN 和细胞表面之间进行循环^[12]。Furin 的胞浆区决定了其在 TGN 上的定位以及随后的循环^[9]。

3 Furin 的作用底物及酶的特性

3.1 Furin 作用底物

Furin 在各种组织和细胞系中均有表达,能水解激活其分泌通道中的许多前体蛋白分子,其作用底物不仅包括肽类激素和神经肽,还包括许多生长因子及其受体、细胞间粘连蛋白、血清蛋白酶、基质金属蛋白酶及细菌外毒素等^[13]。Arg-X-Arg↓ 是 Furin 切割底物时所能识别的最短序列,并且 Furin 可以对不完全符合该序列的前体蛋白进行切割。X 可以是任意氨基酸,若 P2 位置的氨基酸为碱性的 Lys 或 Arg 时,Furin 的切割效率则能提高十倍左右^[14]。Nakayama 等^[3]通过共表达 Furin 和各种前血管紧张素原的突变体后对 Furin 的底物特异性进行了深入研究,并总结出 Furin 识别底物的切割序列遵循以下原则:(i)P1 位置必须为 Arg (ii)除 P1 位的 Arg 外,P2、P4 和 P6 位至少有两个碱性氨基酸以保证 Furin 的切割效率,并且该过程只能发生在酸性条件下 (iii)P1' 位置的氨基酸不应带有疏水性脂肪族侧链。

3.2 Furin 酶的特性

Furin 在较宽的 pH 范围内都能表现出酶的活性,通常 pH 值在 6.0~8.5 之间时可以保持 50% 以上的酶活,pH 为 7.0 时达到一个峰值。Furin 是一种 Ca^{2+} 依赖性的内切蛋白酶,对 Ca^{2+} 的浓度要求十分严格,观察其三维结构模型,预测至少存在两个钙离子结合位点^[15]。当 Ca^{2+} 浓度达到 1-2 mM 时,Furin 蛋白酶可以发挥全部的活性。Furin 也能结合 Mg^{2+} ,但亲和力较弱,20

mM 的 Mg^{2+} 能提高 Furin 的活性。

4 Furin 的生物学功能

Furin 被认为是一个“管家”,能对各种前体蛋白进行加工并参与许多生长因子的成熟过程,例如血管性血友病因子^[16,17]、 β -神经生长因子^[18]、转录生长因子- β 及抑制素等。研究证明,Furin 参与机体内许多重要的生理过程,包括激素成熟、神经生长及胚胎发育等。

β -神经生长因子(β -NGF)是一种神经营养因子,Furin 是其前体的主要内切蛋白酶。 β -NGF 前体是否被 Furin 加工决定了神经元的存活与否。经过加工的 β -NGF 使得神经元细胞得以存活,而未加工的 β -NGF 则会引起神经元的凋亡^[19]。在胚胎发育过程中,跨膜受体 Notch 是否被 Furin 剪切决定了 Notch 激活不同的下游信号通路。Notch 被 Furin 加工后释放胞外结构域,被释放的胞外结构域能与转录调控因子 CSL(C promoter binding factor/suppressor of Hairless/Lag-1)结合,进而激活发育过程中促进细胞间信息交流所需相关基因的表达。而未被 Furin 剪切的 Notch 分子则介导了另一抑制细胞分化的信号通路^[20]。

Furin 对于前体蛋白的切割十分重要,前体蛋白的加工异常会导致功能紊乱,甚至疾病。同时 Furin 等内切蛋白酶还在细菌和病毒感染过程中起重要作用。综上所述,Furin 是前体蛋白转化酶家族中最重要的成员之一,通过对与 Furin 相互作用蛋白的研究,有助于加深人们对 Furin 体内功能和调控方式的认识。Furin 在生物体内有非常重要的调节功能,对它的研究也加深了人们对各种生理生化现象的认识,并可能从中找到新的应用途径。

参考文献(References)

- [1] Roebroek AJ, Schalken JA, Bussemakers MJ, et al. Characterization of human c-fes/-fps reveals a new transcription unit (fur) in the immediately upstream region of the proto-oncogene [J]. Mol Biol Rep, 1986,11(2):117
- [2] Fuller RS, Brake AJ, Thorner J. Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease [J]. Science, 1989,246(4929):482-486
- [3] Kazuhisa, Nakayama. Furin:a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins [J]. Biochem, 1997,327:625-635
- [4] Zhong M, Benjannet S, Lazure C, et al. Functional analysis of human PACE4-A and PACE4-C isoforms: identification of a new PACE4-CS isoform [J]. FEBS Lett, 1996,396(1):31-36
- [5] Hatsuzawa K, Murakami K, Nakayama K. Molecular and enzymatic properties of furin,a Kex2-like endoprotease involved in precursor cleavage at Arg-X-Lys/Arg-Arg sites [J]. Biochem, 1992,111 (3): 296-301
- [6] Lussan J, Benjannet S, Savaria M, et al. The integrity of the RRGDL sequence of the proprotein convertase PC1 is critical for its zymogen and C-terminal processing and for its cellular trafficking [J]. Biochem, 1997,326 (Pt 3):737-744
- [7] Jean-Bernard D, Lyne B, Jean-Michel L, et al. Ectodomain shedding of furin:kinetics and role of the cysteine-rich region [J]. FEBS Letters,

2002,527:309-314

- [8] Henrich S, Lindberg I, Bodew, et al. Proprotein convertase models based on the crystal structures of furin and kexin: explanation of their specificity [J]. J Mol Biol, 2005,345(2):211-227
- [9] Thomas G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002,3(10):753-766
- [10] Anderson E D, Molloy S S, Jean F, et al. The ordered and compartment-specific autoproteolytic removal of the furin intramolecular chaperone is required for enzyme activation [J]. Biol Chem, 2002, Apr 12;277(15):12879-12890
- [11] Shapiro J, Sciaky N, Lee J, et al. Localization of endogenous furin in cultured cell lines [J]. Histochem Cytochem, 1997,45(1):3-12
- [12] Molloy SS, Thomas L, VanSlyke JK, et al. Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface[J]. EMBO, 1994, 13(1):18-33
- [13] Rockwell NC, Thorner JW. The kindest cuts of all: crystal structures of Kex2 and furin reveal secrets of precursor processing [J]. Trends-Biochem Sci, 2004,29:80-87
- [14] Henrich S, Cameron A, Bourenkov GP, et al. The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity [J]. Nat Struct Biol, 2003,10(7):520-526
- [15] Siezen RJ, Creemers JW, Van de Ven WJ. Homology modelling of the catalytic domain of human furin. A model for the eukaryotic subtilisin-like proprotein convertases [J]. Eur J Biochem, 1994,222(2): 255-266
- [16] Wise RJ, Barr PJ, Wong PA, et al. Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990,87(23):9378-9382
- [17] Van de Ven WJ, Voorberg J, Fontijn R, et al. Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes [J]. Mol Biol Rep, 1990,14(4):265-275
- [18] Bresnahan PA, Leduc R, Thomas L, et al. Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo [J]. J Cell Biol, 1990, 111(6 Pt2):2851-2859
- [19] Lee R, Kerman IP, Teng KK, et al. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins [J]. Science, 2001,294(5548):1945-1948
- [20] Vardar D, North CL, Sanchez-IR, et al. Nuclearmagnetic resonance structure of a prototype Lin12-Notch repeat module from human Notch1 [J]. Biochemistry, 2003,42(23):7061-7067

(上接第 3580 页)

- [32] Simpson, J. T. ABySS: a parallel assembler for short read sequence data[J]. Genome Res, 2009, 19: 1117-1123
- [33] Jonathan Butler, Iain MacCallum, Michael Kleber, et al. ALLPA-THS: De novo assembly of whole-genome shotgun microreads [J]. Genome Res, 2008,18: 810-820
- [34] Li, R. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing[J]. Genome Res, 2009, 20: 265-272
- [35] Sudmant, P. H. Diversity of human copy number variation and multi-copy genes[J]. Science, 2010, 330: 641-646
- [36] Alkan, C., Sajjadian, S. & Eichler, E. E. Limitations of next-generation genome sequence assembly[J]. Nature Methods, 2011, 8: 61-65
- [37] Kim Wong, Thomas M Keane, James Stalker, et al. Enhanced structural variant and breakpoint detection using SVMerge by integration of multiple detection methods and local assembly[J]. Genome Biology, 2010, 11, R128:1-9
- [38] Medvedev, P., Fiume, M., Dzamba, M., et al. Detecting copy number variation with mated short reads [J]. Genome Res, 2010, 20: 1613-1622
- [39] Kim, P.M. Analysis of copy number variants and segmental duplications in the human genome: Evidence for a change in the process of formation in recent evolutionary history [J]. Genome Res, 2008,18: 1865-1874
- [40] Cooper, G.M., Nickerson, D.E. & Eichler, E.E. Mutational and selective effects on copy-number variants in the human genome [J]. Nat Genet, 2007, 39:S22-S29