

泛素-蛋白酶体途径在精子生成中的作用

董莲花^{1,2}, 冉茂良^{1,2}, 李智^{1,2}, 彭馥芝^{1,2}, 陈斌^{1,2}

1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 长沙 410128;

2. 畜禽遗传改良湖南省重点实验室, 长沙 410128

摘要: 泛素-蛋白酶体途径(Ubiquitin-proteasome pathway, UPP)是真核细胞内蛋白质主要降解途径, 通过调节蛋白质相互作用、蛋白活性、蛋白定位及信号转导, 进而在细胞周期进程、细胞凋亡、应激反应及机体生长发育等过程发挥重要作用。研究表明, UPP 在人和动物精子生成中的顶体生物合成及精子尾部形成过程起着关键的调控作用, 精子变态过程中 UPP 调控异常导致精子畸形及精子活力降低, 并引发少精子症、不育及睾丸肿瘤等生殖系统疾病。本文综述了 UPP 在动物精子生成过程中的信号传导及调节机制, 以期后续相关研究提供参考。

关键词: 泛素-蛋白酶体途径; 泛素化; 精子发生

The role of ubiquitin-proteasome pathway in spermatogenesis

Lianhua Dong^{1,2}, Maoliang Ran^{1,2}, Zhi Li^{1,2}, Fuzhi Peng^{1,2}, Bin Chen^{1,2}

1. College of Animal Science & Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Hunan Provincial Key Laboratory for Genetic Improvement of Domestic Animal, Changsha 410128, China

Abstract: Ubiquitin-proteasome pathway (UPP) is the main pathway of protein degradation in eukaryotic cells. The UPP plays very important roles in cell cycle progression, apoptosis, stress response and growth and development through regulating protein interaction, protein activity, protein localization and signal transduction. Previous studies have shown that the UPP is essential for regulating acrosome and tail biogenesis during spermatogenesis in human and animals. The dysregulation of UPP during spermatogenesis results in sperm deformity and reduced sperm motility and leads to reproductive system diseases such as oligospermism, infertility and testicular tumors. In this review, we summarized the signal transduction and regulation mechanism of UPP in spermatogenesis, which may provide references for future studies.

Keywords: ubiquitin-proteasome pathway; ubiquitination; spermatogenesis

泛素-蛋白酶体途径(Ubiquitin-proteasome pathway, UPP)通过三酶级联反应将泛素连接于靶蛋白使其泛素化, 介导了真核生物 80%~85% 的蛋白降

解^[1,2]。除蛋白降解外, 泛素化在蛋白质运输^[3]、信号转导^[4]、DNA 修复^[5]、细胞周期进程^[6]、细胞增殖^[7]和凋亡^[8]等过程发挥重要作用。UPP 异常与神经

收稿日期: 2016-04-05; 修回日期: 2016-07-08

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金(编号: CARS-36)[Supported by China Agriculture Research System (No. CARS-36)]

作者简介: 董莲花, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种。E-mail: donglianhua013@126.com

通讯作者: 陈斌, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: chenbin7586@126.com

DOI: 10.16288/j.ycz.16-120

网络出版时间: 2016/8/12 10:44:00

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160812.1044.002.html>

病学^[9]、免疫紊乱^[10]、肿瘤^[11]、糖尿病^[12]等病理过程相关。已有的研究证实,泛素相关组件及去泛素酶在精原细胞到成熟精子中普遍表达,在精子变态过程中的核小体重塑^[13]、顶体生物合成^[14]及精子尾部形成^[15]等过程中发挥重要作用。例如,精子细胞中组蛋白泛素化有助于组蛋白-鱼精蛋白替换,使核内染色质包装更为紧密,形成结构上更为紧凑的转录沉默基因组^[16];顶体形成过程中,高尔基体分泌顶体前颗粒形成顶体囊泡,大量泛素蛋白在反面高尔基网(Trans-Golgi network, TGN)膜和多泡体(Multivesicular bodies, MVBs)膜发现^[17];泛素-蛋白连接酶 CUL4B 与精子鞭毛轴丝微管排列及精子运动能力相关^[18]。研究 UPP 在动物精子生成中的生物学功能及作用机制,可为治疗男性不育、睾丸肿瘤等各种生殖系统疾病及在畜牧生产中获得品质优良的精液和分子育种提供新的理论依据。本文综述了泛素-蛋白酶体通路在精子生成过程中的信号传递及调节机制,以期后续的相关研究提供参考。

1 UPP 概述

UPP 由泛素(Ubiquitin, Ub)、泛素激活酶(Ubiquitin-activating enzyme, UBA, E1)、泛素结合酶(Ubiquitin-conjugating enzyme, UBC, E2)、泛素-蛋白质连接酶(Ubiquitin-protein ligase, E3)及蛋白酶体(Proteasomes)组成,一个或多个泛素分子在 E1、E2、E3 的共同作用下与底物蛋白质共价结合的翻译后修饰过程称为泛素化(Ubiquitination/Ubiqutylation)^[19]。泛素是一种分子量为 8.5 kDa、含 76 个氨基酸残基、在真核生物中广泛存在并高度保守的多肽^[20]。泛素分子含 7 个赖氨酸(K)残基:K6、K11、K27、K29、K33、K48 和 K63,泛素与不同的残基连接形成不同的多聚泛素链,从而发挥不同的生物学功能^[21]。其中 K48 及 K11 连接多聚泛素链通常作为蛋白酶降解信号,单泛素化(Mono-ubiquitination)与 K63 连接则介导内吞、蛋白运输及 DNA 修复等非蛋白酶体功能^[22]。另外,近几年研究显示,泛素链还存在第 8 种连接方式——线性泛素化修饰,即泛素甲硫氨酸 Met1 的氨基基团与另一泛素甘氨酸的羧基连接形成泛素链^[23],线性泛素化修饰在免疫反应过程发挥重要作用^[24]。

泛素-蛋白结合受三酶级联反应调控(图 1)。首先, E1 以 ATP 依赖的方式激活泛素,泛素 C-端的羧基与 E1 的巯基结合形成硫酯键连接;随后 E1 通过交酯化将活化泛素转移至 E2,形成 E2-泛素中间物;最后 E3 募集底物蛋白与 E2-泛素中间物结合,催化转移泛素至靶蛋白赖氨酸残基上,形成泛素异肽链。哺乳动物细胞中含 UBA1 和 UBA6 两种 E1 酶, E1 将泛素转移至大约 40 种 E2 酶,与大约 600 种 E3 相互作用^[19]。E3 主要分 RING(Really Interesting New Gene)、HECT(Homologous to E6-AP Carboxy-Terminus)和 U-box 3 种结构域家族,能特异性识别蛋白保守结构域^[25]。靶蛋白在 E1、E2、E3 的作用下共价连接几个泛素分子,最后多聚泛素化蛋白被 26S 蛋白酶体识别降解^[19]。去泛素化酶(Deubiquitinating enzymes, DUBs)通过水解底物蛋白上的多聚泛素链逆转泛素化,使泛素再循环,以维持蛋白质代谢平衡。哺乳动物中约含 100 多种 DUBs,按照序列保守性可分为以下 5 种:泛素特异性加工酶家族(Ubiquitin specific proteases, USP)、泛素羧基末端水解酶家族(Ubiquitin C-terminal hydrolases, UCH)、OTU 家族(Otu-domain-ubiquitin-aldehyde-binding protein)、MJD 家族(Machado-Joseph disease related enzymes)酶及 JAMM 家族(Jad1/Pad/MPN domain-containing metallo enzymes)^[26]。除了逆转泛素化, DUBs 还与基因转录激活及内吞作用相关^[27]。UPP 通过泛素化特定底物蛋白,调控不同信号通路表达从而在不同生物过程发挥作用。研究显示, UPP 组件在精子生成各阶段表达,在调控精子生成及精子变态成熟等方面具有重要作用^[28]。

2 UPP 与精子形成

雄性动物在早期胚胎发育中,原始生殖细胞(Primordial germ cells, PGCs)围绕 Sertoli 前体细胞形成生殖嵴进而形成睾丸索,随后 PGCs 快速增殖并随着形态的变化而发育成前精原细胞(Prospermatogonia)^[29]。动物出生前,前精原细胞休止于有丝分裂 G₀/G₁ 期,直到动物出生后大量增殖分化为精原细胞(Spermatogonia),同时也有部分生殖母细胞迁移至生精小管基底膜分化为精原干细胞(Spermatogonial stem cells, SSCs)^[30], SSCs 通过有丝分裂增

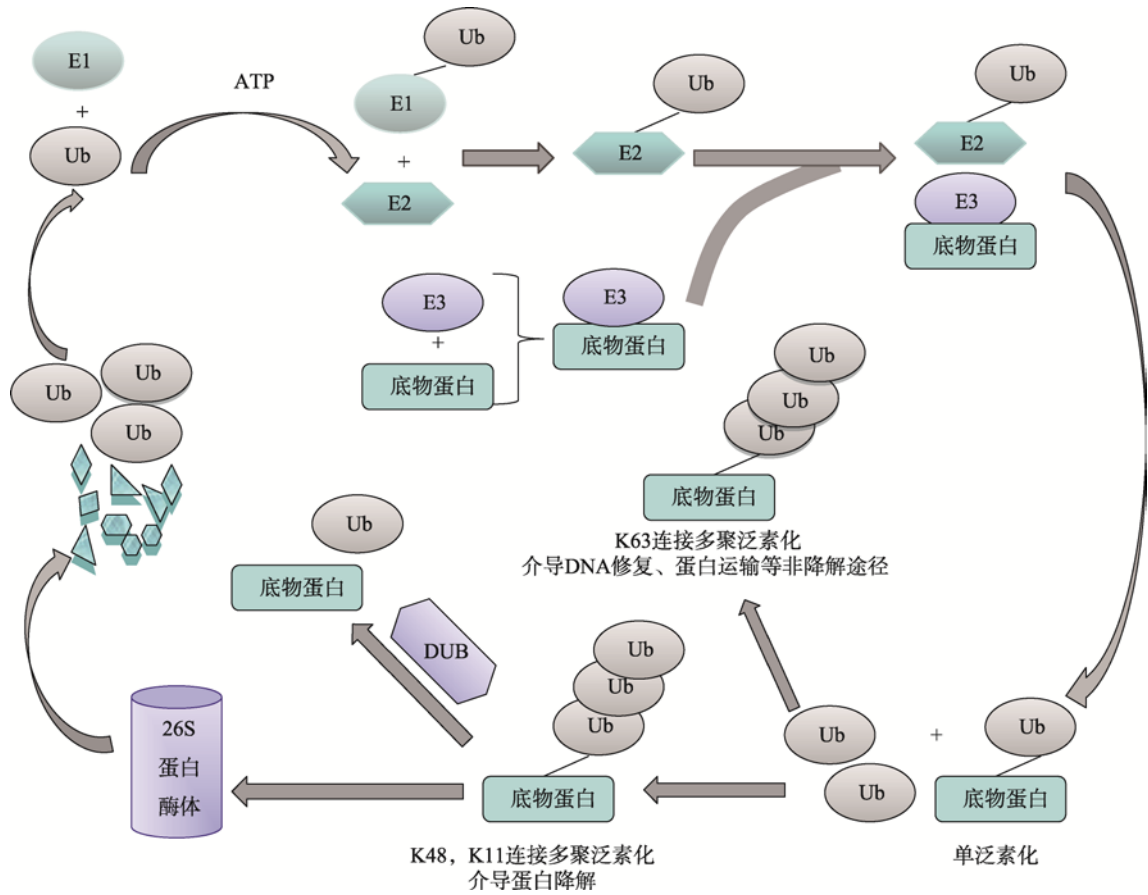


图1 泛素-蛋白酶体通路

Fig. 1 The pathway of ubiquitin proteasome

殖并分化为精母细胞(Spermatocyte)。随后,精母细胞经历两次减速分裂并分化为圆形精子细胞(Round spermatid),圆形精子细胞经过细胞核重塑、顶体生成、尾部形成及胞质脱落等过程形成长形精子细胞(Elongating spermatids)并最终产生转录静止及高度特异化的成熟精子(Sperm)^[31](图2)。精子生成过程由一系列分子精确调控,UPP在精子变态过程中细胞器降解及精子细胞中多余蛋白质的去除中发挥重要调控作用(表1)。

2.1 UPP与核小体重塑

核小体由147bp的DNA片段缠绕分别由两个H2A、H2B、H3及H4组蛋白组成的八聚体核心构成,为染色体的基本单位^[32]。圆形精子细胞核中DNA和组蛋白构成的基因组具有转录活性,长形精子头部形成过程中染色质高度浓缩,形成结构上更为紧凑的转录沉默基因组。染色质浓缩中核小体重

塑由核小体组蛋白去除介导。组蛋白首先由过渡蛋白替换形成中间物,最后被鱼精蛋白替换^[16],鱼精蛋白所带的正电荷残基能结合并中和带负电荷的DNA,使精子核内染色质包装更为紧密^[33]。

组蛋白C-端是甲基化、乙酰化、磷酸化、SUMO化(Sumoylation)及泛素化等翻译后修饰的目标,这些翻译后修饰在调节染色体结构并调控基因表达中具有重要意义^[34]。果蝇精子细胞核组蛋白-鱼精蛋白替换过程中由高泛素化水平、UbcD6(与酵母RAD6和哺乳动物HR6B同源)、SUMO化标记^[35]。在大鼠长形精子细胞中观察到泛素化的H2A、H3、TH3(睾丸特异性H3)及H2B,与松散染色质并精确去除核小体或将组蛋白靶向蛋白酶体相关^[36]。研究显示,HECT E3酶LASU1与睾丸特异性E2酶UBC4互作^[37],泛素化所有的核心组蛋白并形成多聚泛素链,参与精子细胞组蛋白降解^[36]。LASU1 mRNA在出生后(Post-natal day, PND)10~20天的大鼠睾丸组织中表

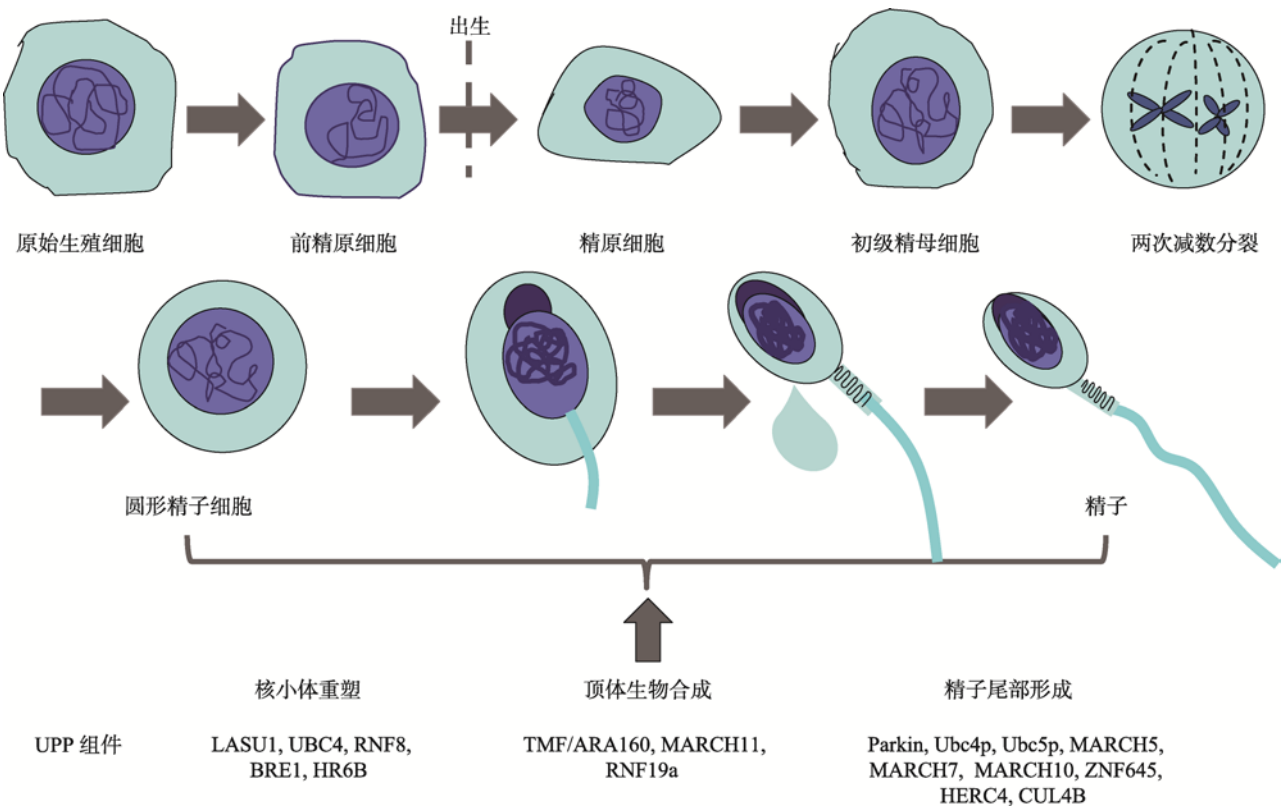


图 2 精子发生中泛素-蛋白酶通路相关组件
Fig. 2 The components of ubiquitin proteasome pathway during spermatogenesis

表 1 精子形成相关泛素酶
Table 1 Ubiquitination enzymes associated with spermatogenesis

类别	名称	底物	表达/功能	物种	参考文献
E1	UBA1	Unknown	精原细胞、精母细胞、精子细胞核及圆形和长形精子细胞顶体帽；在精子获能、顶体反应及卵穿透中具有重要作用	Porcine	[49]
E2	UBC4	组蛋白	睾丸特异性表达；泛素化组蛋白	Rattus norvegicus	[37]
E3s	CUL4B	INSL6	睾丸生精细胞及 Sertoli 细胞；与精子鞭毛结构及运动相关	Mus musculus	[18]
	MARCH11	SAMT 家族蛋白	主要表达于精子细胞 TGN 及 MVBs；与 TGN-MBV 途径的蛋白分选相关	Mus musculus	[17]
	MARCH10	Unknown	精子尾部鞭毛主段的纤维鞘内；与精子尾部形成相关	Rattus norvegicus	[15]
	MARCH7	Unknown	高表达于生精细胞核伸长及尾部形成阶段；与精子尾部形成相关	Rattus norvegicus	[48]
	Parkin	Unknown	Undefined；与精子线粒体形态发生相关	Drosophila	[51]
	RNF19a/Dorfin	Psmc3	表达于精子顶体囊泡、外顶体膜和 Acroplaxome；调控蛋白降解	Rattus norvegicus	[47]
	ZNF645	Unknown	表达于成熟精子核膜及尾部；与精子生成及其质量调控相关	Homo sapiens	[56]
	HERC4	Unknown	高表达于睾丸组织，特别是生精过程中；与精子成熟及胞浆小滴去除相关	Mus musculus	[57]
	TMF/ARA160	Unknown	表达于精母细胞及精子细胞高尔基体；调控精子变态	Mus musculus	[14]

达, 且其水平随着日龄的增加而减少, 其蛋白质在精原细胞至粗线期精母细胞细胞核呈现高表达, 而在组蛋白降解后的精子细胞则未检测到表达。

在果蝇中, 组蛋白由 H4 乙酰化和 H2A 单泛素化介导去除, 小鼠 E3 酶 RNF8 及蛋白酶体活化因子 PA200 缺失的研究也为 H2A 泛素化和 H4 乙酰化介导核小体去除提供依据。RNF8 或 PA200 缺失小鼠表现出精子细胞中核小体去除缺陷, RNF8 缺失突变生殖细胞减数分裂过程中表现出泛素化 H2A(uH2A) 的缺失。除泛素化 H2A, RNF8 还募集 H4K16(组蛋白 H4 第 16 位赖氨酸)乙酰化所需的乙酰转移酶 MOF(Male on the first)^[13]。PA200 能识别并结合乙酰化组蛋白, 使其在蛋白酶体 20S 中心降解^[38], PA200 缺失小鼠由于生精障碍导致生殖能力下降^[39]。此外, E2 酶 HR6B 破坏小鼠睾丸生精细胞大量凋亡及精子头部形态异常而导致不育, *Hr6b* 缺陷精子中组蛋白替换不全^[40]。在酵母中, E2 酶 RAD6 与 E3 酶 BRE1 连接催化组蛋白 H2B 单泛素化^[38]。RAD6/BRE1 介导的 H2B 单泛素随后触发组蛋白 H3 甲基化, 导致转录激活, 此过程在高等生物中具有进化保守性^[41]。

由此可见, UPP 介导的组蛋白替换为精子细胞核中核小体重塑的必要过程, 在精子形成过程中染色质浓缩及 DNA 损伤保护具有重要作用, 该过程的畸变导致男性不育^[42]。

2.2 UPP 与顶体生物合成

高尔基体来源的前顶体囊泡附着于核膜并随着更多的前顶体囊泡融合增大形成顶体, 前顶体囊泡的组装融合由膜转运机制调控, 如果该机制中膜流向顶体受到干扰则导致顶体破坏及圆头精子的产生^[43]。研究证实, 泛素化在膜转运机制进而在精子顶体生物合成过程中发挥重要作用, 大鼠精子顶体形成过程各阶段均检测到泛素化蛋白的存在^[44]。电镜成像显示泛素信号存在于顶体与高尔基体之间的运输囊泡基质中, 在顶体不同区域高表达。在精母细胞与精子细胞高尔基体检测到 E3 酶 TMF/ARA160 (TATA element modulatory factor/androgen receptor-coactivator of 160 kDa), 而在成熟精子中则未检测到。TMF/ARA160 纯合缺失小鼠精子细胞核表面顶体前囊泡缺失、精子尾部卷曲、精子能动性差, 并最终

导致不育^[14]。在体细胞中, TMF/ARA160 通过与小 G 蛋白(Small GTP-binding proteins)Rab6 及保守的低聚高尔基(Conserved oligomeric Golgi, COG)形成复合物(TMf-Rab6-COG), 参与高尔基体囊泡栓系及转运^[14]。TMF/ARA160 缺失精子细胞的前顶体囊泡不发生相互融合, 也不附着于核膜, 其可能原因为 TMF-Rab6-COG 复合物的缺乏^[14]。TMF/ARA160 介导的泛素化可能参与精子顶体生物合成, 但其作用底物蛋白的确定有待进一步研究。

部分新合成蛋白质从高尔基体-顶体途径分选出来并传递到内体系统。在酵母和体细胞中, 单泛素或 K63 泛素连接标记作为跨膜蛋白向内体系统中 MVBs 分选转运信号。在 MVB 途径中, 泛素化蛋白由内体蛋白分选转运装置(Endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)分选进入 MVBs 腔内囊泡并随后被运送至溶酶体^[45]。在精子形成过程中, 蛋白在 TGN、顶体与 MVBs 中泛素化^[44], 可能有助于在顶体和 MVB 途径的蛋白分选。已有研究显示, TGN-MVB 之间蛋白质运输由 E3 酶家族成员膜相关 RING-CH11(Membrane-associated RING-CH 11, MARCH11)调控^[17]。MARCH11 主要表达于精子细胞 TGN 及 MVBs, MARCH11 能泛素化精子发生相关多拷贝跨膜蛋白(Spermatogenesis-associated multicopy transmembrane, SAMT)^[17]。SAMT 为四跨膜蛋白家族成员, 其中 *Samt1* mRNA 及其蛋白特定表达于睾丸, 并最先在 PND25 小鼠生殖细胞检测到。免疫组化分析表明, SAMT1 特异性表达于单倍体精子细胞顶体。共聚焦显微镜分析表明, SAMT1 与 MARCH11、TGN-MVB 标志—含岩藻糖糖蛋白及溶酶体相关膜蛋白 2(Lysosome-associated membrane protein 2, LAPM2)共定位。SAMT 家族其他蛋白成员也显示出类似的表达特征、细胞内定位及生化特性^[17]。这些结果表明, SMAT 家族蛋白为 MARCH11 底物并通过 TGN-MVB 途径运送至溶酶体降解。此外, 细胞化学研究显示 MARCH11 与顶体形成期岩藻糖蛋白质泛素化并从 TGN 运输至 MVBs 相关, 表明 MARCH11 可能调控某些糖蛋白的分类并将其靶向 MVB 途径^[46]。

由 F-肌动蛋白(F-actin)及角蛋白 5(Keratin 5)构成的细胞骨架—顶体下层(Acroplaxome/Subacroso-

mal layer)为顶体膜与核膜之间的紧密连接。Acroplaxome 中的肌球蛋白 Va 及膜转运调节因子 Rab27a/b, 可能参与顶体囊泡转运^[47]。研究表明, 大鼠 E3 酶 RNF19a(Dorfin)存在于顶体囊泡及精子细胞/精子的外顶体膜和 Acroplaxome, RNF19a 与 Psmc3 形成的复合物为 26S 蛋白酶体亚基^[47]。此外, 顶体/Acroplaxome 区检测到 K48 连接蛋白泛素化信号^[48], 表明 RNF19a 可能介导调控异常或未组装顶体/Acroplaxome 蛋白至蛋白酶体降解, 但 RNF19a 的底物蛋白未知, 它在顶体形成的机制需进一步研究阐明。此外, 近来研究表明 E1 酶 UBA1 在猪圆形和长形精子细胞顶体帽形成、精子获能、顶体反应及卵穿透中具有重要作用^[49]。

2.3 UPP 与精子尾部形成

精子尾部结构在精子形成过程中至关重要, 精子尾部正确的线粒体排列及微管聚集是保证具有运动能力的精子形成的关键。哺乳动物中, 鞭毛轴丝为精子尾部鞭毛的核心结构, 由 1 对中央微管及外周的 9 对二联体微管组成, 鞭毛轴丝外围包围 9 条致密纤维组成纤维鞘。精子线粒体在尾部中段组装成围绕纤维鞘的紧凑螺旋结构—线粒体鞘, 为精子存活运动、精子获能及授精提供快速而高效的能源供应^[50], 线粒体形变过程中 UPP 缺陷会影响线粒体的功能。研究表明, 果蝇 E3 酶 Parkin 于精子线粒体形态发生必不可少^[51], 而 E3 酶 Ubc4p 和 Ubc5p 的缺失, 导致酵母线粒体形态和遗传缺陷^[52]。最近研究发现, K48 连接泛素链在大鼠长形精子细胞及小鼠精子尾部中段形成^[53], 线粒体内膜蛋白—抑制素 (Prohibitin, PHB)为精子线粒体泛素化底物^[54], 可能与父系 mtDNA 在卵母细胞降解相关。此外, E3 酶 MARCH5 靶向体细胞中一些线粒体蛋白泛素化, 可能在精子线粒体泛素化中也发挥重要作用^[55]。

多种 UPP 组件与精子发育中精子尾部形成相关。E3 酶 MARCH10 位于鞭毛主段的纤维鞘内, 可能与长形精子细胞鞭毛形成相关^[15]; MARCH 7 mRNA 高表达于睾丸和卵巢组织, 大鼠睾丸 MARCH 7 mRNA 在精原细胞中弱表达并随着细胞发育表达量逐渐增加, MARCH7 蛋白在晚期圆形精子细胞至长形精子细胞及成熟精子中表达, 并高表达于生

精细胞核伸长及尾部形成阶段^[50]; 人环指蛋白 ZNF645 分布于成熟精子核膜及尾部^[56]; 纯合缺失 *Herc4* 雄性小鼠首窝产仔 50% 的个体体型偏小、精子运动性降低, 许多成熟精子尾部带有胞浆小滴, 表明 E3 酶 HERC4 在精子成熟中去除胞浆小滴具有关键作用^[57]。此外, 胞浆小滴中含有多种 UPP 成分, 如泛素、E2 酶、去泛素酶 UCHL1 及多种蛋白酶体核心亚基 α 和 β MECL-1/b2i, 可能参与调控胞浆小滴内蛋白代谢^[58]。

CUL4 为 Cullin 蛋白家族成员之一, 其 Cullin 结构域可与含 RING 结构域蛋白形成 Cullin-RING 泛素连接酶-CRL4 复合物 (Cullin-ring finger ligase-4 (CRL4) complex)介导蛋白泛素化^[59]。哺乳动物含两种 *Cul4* 基因: *Cul4a* 和 *Cul4b*, 其中 *Cul4b* 为 X 染色体连锁基因^[16]。研究表明, 胰岛素样蛋白 6 (Insulin family member 6, INSL6)为雄性生殖细胞中 CUL4B 底物蛋白, 由 CUL4B 多聚泛素化降解。生殖细胞条件性敲除 *Cul4b* 的雄性小鼠具有正常睾丸形态结构及精子数目, 但精子出现鞭毛轴丝微管及外围致密纤维排列缺陷, 导致精子运动能力受损及雄鼠不育^[18]。

3 精子生成中的 DUBs

大量研究证明泛素酶在精子生成中生殖母细胞分化到精子变态等各阶段发挥重要作用。然而, DUBs 对精子生成中酶的表达及亚细胞定位同样具有关键作用, DUBs 通过参与精子生成中蛋白质周转代谢, 直接或间接调控精子生成。研究表明, 哺乳动物中含 5 种 UCHs 酶 (UCHL1, UCHL 2, UCHL 3, UCHL 4, UCHL 5), *Uchl1* 及 *Uchl4* mRNA 在小鼠精原细胞表达, *Uchl3* 和 *Uchl5* mRNA 则主要在精母细胞及精子细胞表达^[60]。其中 *Uchl1* 和 *Uchl3* 具有高序列相似性, 但它们在精子生成不同阶段不同的表达模式, 表明其发挥不同的生物学功能^[59]。*Uchl1* 在精原干细胞有丝分裂增殖中发挥作用, *Uchl3* 则在精母细胞减数分裂及附睾精子成熟发挥作用^[61]。此外, *Uchl1* 和 *Uchl3* 在附睾的表达也表现出区域特异性。*Uchl1* 在精子成熟主要场所的附睾头高表达, *Uchl3* 则在精子储存主要场所的附睾尾高表达^[62]。研究显示 *Uchl1* 在调节细胞凋亡中具有重

要作用,小鼠睾丸过表达 *Uchl1* 导致精母细胞凋亡数量增加,出现精母细胞粗线期阻滞^[60],敲除 *Uchl1* 导致 PND7~14 小鼠减数分裂前生殖细胞数量及 TRP53、Bax、Caspase-3 等凋亡蛋白水平的增加^[63]。肿瘤抑制因子 CYLD(Cylindromatosis, 头帕肿瘤综合征蛋白)为含 UCH 结构域及细胞运动相关结构域 CAP-gly 的去泛素化酶^[64]。CYLD 负向调控核转录因子 κ B(NF- κ B)信号通路激活素—受体相互作用蛋白 1(Receptor-interacting protein 1, RIP1),通过结合 RIP1 抑制其泛素化及信号功能。CYLD 缺失导致 NF- κ B 信号组成性激活及抗凋亡基因异常表达, PND28 小鼠 CYLD 失活出现精子细胞缺乏、长形精子顶体形成缺陷及附睾精子的完全缺失,表现出睾丸萎缩及繁殖能力的缺失^[65]。

USP家族也在精子生成中发挥重要作用。*Usp2*^{-/-}小鼠睾丸具有正常形态及重量,但这些小鼠精子能动性差且不具授精能力^[66];去泛素酶 USP9Y 部分缺失与男性不育症相关^[67];小鼠睾丸 USP14 缺乏导致睾丸体积减少、精子生成减少、精子形态异常及小鼠不育^[68]; *Usp26* 为睾丸特异表达的 X 连锁基因,小鼠睾丸切片免疫染色显示 USP26 定位于血睾屏障、精子细胞及精子头部^[69], *Usp26* 单核苷酸多态性与精子运动能力相关^[70]; Northern blot 分析表明 USP42 主要在小鼠脑、肺、胸腺及睾丸表达,小鼠出生后 2 周至圆形精子细胞阶段 USP42 表达量上升,而浓缩精子中表达量降低,可能在小鼠精子发生过程中发挥重要作用^[71]; USP8(UBPy)在小鼠睾丸高表达,精子细胞内 USP8 与 ESCRT 的信号转导衔接分子 2(Signal transducing adaptor molecule 2, STAM2)共定位于早期圆形精子细胞的早期内体之后积聚于顶体,通过调控内体至顶体运输途径中的蛋白分选及泛素化从而参与顶体形成^[72]。在体细胞中, USP8 与 ESCRT 调节泛素再循环途径和溶酶体降解途径之间的胞内分选^[73]。此外,研究表明 USP8 通过与微管蛋白相互作用,以微管连接并标记囊泡,促进顶体生物合成过程中的顶体前囊泡迁移^[72,74]。由此可见, DUBs 在精子生成调节中具有重要作用,但其具体作用机制尚不明确,对 DUBs 进行功能缺失研究为鉴定其特异底物及确定 DUBs 在睾丸精子生成中的作用具有重要意义。

4 结语与展望

UPP 在精子生成中发挥重要作用, UPP 相关组件或 UPP 调控异常导致生精障碍并引发睾丸疾病。例如, *Cul4a*^{-/-}小鼠减数第一次分裂前期精母细胞缺乏、睾丸细胞凋亡增加,精子产生数量急剧减少,且附睾精子细胞表现出严重的形态缺陷及活力降低^[75]; E3 酶 WWP1 在雄激素非依赖性前列腺癌细胞过表达,可能为前列腺癌 TGF- β 失活的致癌因子^[76]; Luddi 等临床研究也显示 *Usp9y* 与少精子症或无精子症相关^[77]; 睾丸 USP14 缺乏导致睾丸体积减少、精子生成减少及精子形态异常^[68]。泛素酶和去泛素化酶的生化特性和亚细胞定位及其底物的研究是阐明 UPP 介导的精子生成调控机制的基础,越来越多的研究显示 E3 酶在精子生成过程具有重要作用,但要确定不同 E3 酶所作用的特定 E2 酶及底物蛋白还需大量研究。此外,不同泛素连接方式在细胞中发挥不同的生物学功能,阐明精子发生过程中蛋白质泛素化类型是十分必要的。深入研究 UPP 在精子生成过程中发挥的生物学功能及其具体作用方式和机制,为揭示男性不育发病机理并最终为其提供有效的治疗思路具有十分重要的意义。

参考文献(Reference):

- [1] Lu L, Li D, He FC. Bioinformatics advances in protein ubiquitination. *Hereditas (Beijing)*, 2013, 35(1): 17–26. 卢亮, 李栋, 贺福初. 蛋白质泛素化修饰的生物信息学研究进展. 遗传, 2013, 35(1): 17–26. [DOI]
- [2] Chen K, Cheng HH, Zhou RJ. Molecular mechanisms and functions of autophagy and the ubiquitin-proteasome pathway. *Hereditas (Beijing)*, 2012, 34(1): 5–18. 陈科, 程汉华, 周荣家. 自噬与泛素化蛋白降解途径的分子机制及其功能. 遗传, 2012, 34(1): 5–18. [DOI]
- [3] Hao YH, Doyle JM, Ramanathan S, Gomez TS, Jia D, Xu M, Chen ZJ, Billadeau DD, Rosen MK, Potts PR. Regulation of WASH-dependent actin polymerization and protein trafficking by ubiquitination. *Cell*, 2013, 152(5): 1051–1064. [DOI]
- [4] Portbury AL, Ronnebaum SM, Zungu, M, Patterson C, Willis MS. Back to your heart: ubiquitin proteasome system-regulated signal transduction. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(3): 526–537. [DOI]
- [5] Panier S, Ichijima Y, Fradet-Turcotte A, Leung CCY, Kaustov L, Arrowsmith CH, Durocher D. Tandem protein

- interaction modules organize the ubiquitin-dependent response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell*, 2012, 47(3): 383–395. [DOI]
- [6] Malynn BA, Ma A. Ubiquitin makes its mark on immune regulation. *Immunity*, 2010, 33(6): 843–852. [DOI]
- [7] Chen BB, Glasser JR, Coon TA, Zou CB, Miller HL, Fenton M, McDyer JF, Boyiadzis M, Mallampalli RK. F-box protein FBXL2 targets cyclin D2 for ubiquitination and degradation to inhibit leukemic cell proliferation. *Blood*, 2012, 119(13): 3132–3141. [DOI]
- [8] Wan LX, Tan MJ, Yang J, Inuzuka H, Dai XP, Wu T, Liu J, Shaik S, Chen GA, Deng J, Malumbres M, Letai A, krishner MW, Sun Y, Wei WY. APC^{Cdc20} Suppresses apoptosis through targeting bim for ubiquitination and destruction. *Dev Cell*, 2014, 29(4): 377–391. [DOI]
- [9] Huntwork-Rodriguez S, Wang B, Watkins T, Ghosh AS, Pozniak CD, Bustos D, Newton K, Kirkpatrick DS, Lewcock JW. JNK-mediated phosphorylation of DLK suppresses its ubiquitination to promote neuronal apoptosis. *J Cell Biol*, 2013, 202(5): 747–763. [DOI]
- [10] Fiil BK, Damgaard RB, Wagner SA, Keusekotten K, Fritsch M, Bekker-Jensen S, Mailand N, Choudhary C, Komander D, Gyrd-Hansen M. OTULIN restricts Met1-linked ubiquitination to control innate immune signaling. *Mol Cell*, 2013, 50(6): 818–830. [DOI]
- [11] Rajbhandari P, Schalper KA, Solodin NM, Ellison-Zelski SJ, Lu KP, Rimm DL, Alarid ET. Pin1 modulates ERα levels in breast cancer through inhibition of phosphorylation-dependent ubiquitination and degradation. *Oncogene*, 2014, 33(11): 1438–1447. [DOI]
- [12] Nawa A, Fujita-Hamabe W, Tokuyama S. Involvement of ubiquitination in the decrease of intestinal P-glycoprotein in a streptozotocin-induced diabetic mouse model. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2012, 27(5): 548–552. [DOI]
- [13] Lu LY, Wu JX, Ye L, Gavrilina GB, Saunders TL, Yu XC. RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Dev Cell*, 2010, 18(3): 371–384. [DOI]
- [14] Lerer-Goldshtein T, Bel S, Shpungin S, Pery E, Motro B, Goldstein RS, Bar-Sheshet SI, Breitbart H, Nir U. TMF/ARA160: A key regulator of sperm development. *Dev Biol*, 2010, 348(1): 12–21. [DOI]
- [15] Iyengar PV, Hirota T, Hirose S, Nakamura N. Membrane-associated RING-CH 10 (MARCH10 protein) is a microtubule-associated E3 ubiquitin ligase of the spermatid flagella. *J Biol Chem*, 2011, 286(45): 39082–39090. [DOI]
- [16] Wykes SM, Krawetz SA. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem*, 2003, 278(32): 29471–29477. [DOI]
- [17] Yogo K, Tojima H, Ohno JY, Ogawa T, Nakamura N, Hirose S, Takeya T, Kohsaka T. Identification of SAMT family proteins as substrates of MARCH11 in mouse spermatids. *Histochem Cell Biol*, 2012, 137(1): 53–65. [DOI]
- [18] Yin Y, Liu LR, Yang CY, Lin CX, Veith GM, Wang CH, Sutovsky P, Zhou PB, Ma L. Cell autonomous and non-autonomous function of CUL4B in Mouse Spermatogenesis. *J Biol Chem*, 2016, doi: 10.1074/jbc.M115.699660. [DOI]
- [19] Kleiger G, Mayor T. Perilous journey: a tour of the ubiquitin-proteasome system. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(6): 352–359. [DOI]
- [20] Nir I, Huttner D, Meller A. Direct sensing and discrimination among Ubiquitin and Ubiquitin chains using solid-state nanopores. *Biophys J*, 2015, 108(9): 2340–2349. [DOI]
- [21] Ikeda F, Dikic I. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. *EMBO Rep*, 2008, 9(6): 536–542. [DOI]
- [22] Komander D, Rape M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81(1): 203–229. [DOI]
- [23] He S, Zhang LQ. Research progress in linear ubiquitin modification. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(9): 911–917. 何珊, 张令强. 线性泛素化修饰研究进展. *遗传*, 2015, 37(9): 911–917. [DOI]
- [24] Kulathu Y, Komander D. Atypical ubiquitylation—the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(8): 508–523. [DOI]
- [25] Budhidarmo R, Nakatani Y, Day CL. RINGs hold the key to ubiquitin transfer. *Trends Biochem Sci*, 2012, 37(2): 58–65. [DOI]
- [26] Sahtoe DD, Sixma TK. Layers of DUB regulation. *Trends Biochem Sci*, 2015, 40(8): 456–467. [DOI]
- [27] Nijman SMB, Luna-Vargas MPA, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AMG, Sixma TK, Bernards R. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*, 2005, 123(5): 773–786. [DOI]
- [28] Meccariello R, Chianese R, Ciarabella V, Fasano S, Pierantoni R. Molecular chaperones, cochaperones, and ubiquitination/deubiquitination system: involvement in the production of high quality spermatozoa. *BioMed Res Int*, 2014, 2014: 561426. [DOI]
- [29] Kolasa A, Misiakiewicz K, Marchlewicz M, Wiszniewska B. The generation of spermatogonial stem cells and spermatogonia in mammals. *Reprod Biol*, 2012, 12(1): 5–23. [DOI]
- [30] Chuykin I, Stauske M, Guan KM. Spermatogonial stem cells. In: Steinhoff G, ed. *Regenerative Medicine*. Netherlands: Springer, 2013: 219–249. [DOI]
- [31] O'Donnell L, O'Bryan MK. Microtubules and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 30: 45–54. [DOI]
- [32] McKay DJ, Lieb JD. A split personality for nucleosomes.

- Cell*, 2014, 159(6): 1249–1251. [DOI]
- [33] Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod*, 1991, 44(4): 569–574. [DOI]
- [34] Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*, 2011, 21(3): 381–395. [DOI]
- [35] Rathke C, Baarends WM, Jayaramaiah-Raja S, Bartkuhn M, Renkawitz R, Renkawitz-Pohl R. Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. *J Cell Sci*, 2007, 120(9): 1689–1700. [DOI]
- [36] Chen HY, Sun JM, Zhang Y, Davie JR, Meistrich ML. Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *J Biol Chem*, 1998, 273(21): 13165–13169. [DOI]
- [37] Liu ZQ, Miao DS, Xia QW, Hermo L, Wing SS. Regulated expression of the ubiquitin protein ligase, E3^{Histone}/LASU1/Mule/ARF-BP1/HUWE1, during spermatogenesis. *Dev Dyn*, 2007, 236(10): 2889–2898. [DOI]
- [38] Qian MX, Pang Y, Liu CH, Haratake K, Du BY, Ji DY, Wang GF, Zhu QQ, Song Wei, Yu Y, Zhang XX, Huang HT, Miao SY, Chen LB, Zhang ZH, Liang YN, Liu S, Cha H, Yang D, Zhai YG, Komatsu T, Tsuruta F, Li HT, Cao C, Li W, Li GH, Cheng YF, Chiba T, Wang LF, Goldberg AL, Shen Y, Qiu XB. Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis. *Cell*, 2013, 153(5): 1012–1024. [DOI]
- [39] Khor B, Bredemeyer AL, Huang CY, Turnbull IR, Evans R, Maggi LB Jr, White JM, Walker LM, Carnes K, Hess AR, Sleekman BP. Proteasome activator PA200 is required for normal spermatogenesis. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(8): 2999–3007. [DOI]
- [40] Roest HP, van Klaveren J, de Wit J, van Gurp CG, Koken MHM, Vermey M, van Roijen JH, Hoogerbrugge JW, Vreeburg JTM, Baarends WM, Bootsma D, Grootegoed JA, Hoeijmakers JHJ. Inactivation of the HR6B ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification. *Cell*, 1996, 86(5): 799–810. [DOI]
- [41] Wood A, Krogan NJ, Dover J, Schneider J, Heidt J, Boateng MA, Dean K, Golshani A, Zhang Y, Greenblatt JF, Johnston M, Shilatifard A. Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol Cell*, 2003, 11(1): 267–274. [DOI]
- [42] Boissonnas CC, Jouannet P, Jammes H. Epigenetic disorders and male subfertility. *Fertil Steril*, 2013, 99(3): 624–631. [DOI]
- [43] Roqueta-Rivera M, Abbott TL, Sivaguru M, Hess RA, Nakamura MT. Deficiency in the omega-3 fatty acid pathway results in failure of acrosome biogenesis in mice. *Biol Reprod*, 2011, 85(4): 721–732. [DOI]
- [44] Haraguchi CM, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Hoshi K, Yokota S. Ubiquitin signals in the developing acrosome during spermatogenesis of rat testis: an immunoelectron microscopic study. *J Histochem Cytochem*, 2004, 52(11): 1393–1403. [DOI]
- [45] Shields SB, Piper RC. How ubiquitin functions with ESCRTs. *Traffic*, 2011, 12(10): 1306–1317. [DOI]
- [46] Morokuma Y, Nakamura N, Kato A, Notoya M, Yamamoto Y, Sakai Y, Fukuda H, Yamashina S, Hirata Y, Hirose S. MARCH-XI, a novel transmembrane ubiquitin ligase implicated in ubiquitin-dependent protein sorting in developing spermatids. *J Biol Chem*, 2007, 282(34): 24806–24815. [DOI]
- [47] Rivkin E, Kierszenbaum AL, Gil M, Tres LL. Rnf19a, a ubiquitin protein ligase, and Psmc3, a component of the 26S proteasome, tether to the acrosome membranes and the head-tail coupling apparatus during rat spermatid development. *Dev Dyn*, 2009, 238(7): 1851–1861. [DOI]
- [48] Zhao BQ, Ito K, Iyengar PV, Hirose S, Nakamura N. MARCH7 E3 ubiquitin ligase is highly expressed in developing spermatids of rats and its possible involvement in head and tail formation. *Histochem Cell Biol*, 2013, 139(3): 447–460. [DOI]
- [49] Yi YJ, Zimmerman SW, Manandhar G, Odhiambo JF, Kennedy C, Jonáková V, Maňásková-Postlerová P, Sutovsky M, Park CS, Sutovsky P. Ubiquitin-activating enzyme (UBA1) is required for sperm capacitation, acrosomal exocytosis and sperm-egg coat penetration during porcine fertilization. *Int J Androl*, 2012, 35(2): 196–210. [DOI]
- [50] Rajender S, Rahul P, Mahdi AA. Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. *Mitochondrion*, 2010, 10(5): 419–428. [DOI]
- [51] Riparbelli MG, Callaini G. The *Drosophila parkin* homologue is required for normal mitochondrial dynamics during spermiogenesis. *Dev Biol*, 2007, 303(1): 108–120. [DOI]
- [52] Fisk HA, Yaffe MP. A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 1999, 145(6): 1199–1208. [DOI]
- [53] Luo SM, Ge ZJ, Wang ZW, Jiang ZZ, Wang ZB, Ouyang YC, Hou Y, Schatten H, Sun QY. Unique insights into maternal mitochondrial inheritance in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(32): 13038–13043. [DOI]
- [54] Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol Reprod*, 2000, 63(2): 582–590. [DOI]
- [55] Nakamura N, Kimura Y, Tokuda M, Honda S, Hirose S. MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep*,

- 2006, 7(10): 1019–1022. [DOI]
- [56] Liu YQ, Bai G, Zhang H, Su D, Tao DC, Yang Y, Ma YX, Zhang SZ. Human RING finger protein ZNF645 is a novel testis-specific E3 ubiquitin ligase. *Asian J Androl*, 2010, 12(5): 658–666. [DOI]
- [57] Rodriguez CI, Stewart CL. Disruption of the ubiquitin ligase *HERC4* causes defects in spermatozoon maturation and impaired fertility. *Dev Biol*, 2007, 312(2): 501–508. [DOI]
- [58] Fischer KA, Van Leyen K, Lovercamp KW, Manandhar G, Sutovsky M, Feng D, Safranski T, Sutovsky P. 15-Lipoxygenase is a component of the mammalian sperm cytoplasmic droplet. *Reproduction*, 2005, 130(2): 213–222. [DOI]
- [59] Jackson S, Xiong Y. CRL4s: the CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Trends Biochem Sci*, 2009, 34(11): 562–570. [DOI]
- [60] Wang YL, Liu WZ, Sun YJ, Kwon J, Setsuie R, Osaka H, Noda M, Aoki S, Yoshikawa Y, Wada K. Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 arrests spermatogenesis in transgenic mice. *Mol Reprod Dev*, 2006, 73(1): 40–49. [DOI]
- [61] Kwon J, Wang YL, Setsuie R, Sekiguchi S, Sakurai M, Sato Y, Lee WW, Ishii Y, Kyuwa S, Noda M, Wada K, Yoshikawa Y. Developmental regulation of ubiquitin C-terminal hydrolase isozyme expression during spermatogenesis in mice. *Biol Reprod*, 2004, 71(2): 515–521. [DOI]
- [62] Jervis KM, Robaire B. Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. *Biol Reprod*, 2001, 65(3): 696–703. [DOI]
- [63] Kwon J, Mochida K, Wang YL, Sekiguchi S, Sankai T, Aoki S, Ogura A, Yoshikawa Y, Wada K. Ubiquitin C-terminal hydrolase L-1 is essential for the early apoptotic wave of germinal cells and for sperm quality control during spermatogenesis. *Biol Reprod*, 2005, 73(1): 29–35. [DOI]
- [64] Wei JC, He FC, Wang J. CYLD: a deubiquitinase. *Chin Bull Life Sci*, 2013, 25(4): 352–357.
魏俊成, 贺福初, 王建. 去泛素化酶 CYLD. 生命科学, 2013, 25(4): 352–357. [DOI]
- [65] Wright A, Reiley WW, Chang M, Jin W, Lee AJ, Zhang MY, Sun SC. Regulation of early wave of germ cell apoptosis and spermatogenesis by deubiquitinating enzyme CYLD. *Dev Cell*, 2007, 13(5): 705–716. [DOI]
- [66] Bedard N, Yang YM, Gregory M, Cyr DG, Suzuki J, Yu XM, Chian RC, Hermo L, O'Flaherty C, Smith CE, Clarke HJ, Wing SS. Mice lacking the USP2 deubiquitinating enzyme have severe male subfertility associated with defects in fertilization and sperm motility. *Biol Reprod*, 2011, 85(3): 594–604. [DOI]
- [67] Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A, Lenzi A, Foresta C. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(3): 762–770. [DOI]
- [68] Vaden JH, Bhattacharyya BJ, Chen PC, Watson JA, Marshall AG, Phillips S, Wilson JA, King GD, Miller RJ, Wilson SM. Ubiquitin-specific protease 14 regulates c-Jun N-terminal kinase signaling at the neuromuscular junction. *Mol Neurodegener*, 2015, 10(1): 3. [DOI]
- [69] Lin YW, Hsu TH, Yen PH. Localization of ubiquitin specific protease 26 at blood-testis barrier and near Sertoli cell-germ cell interface in mouse testes. *Int J Androl*, 2011, 34(5pt2): e368–e377. [DOI]
- [70] Shi YC, Wei L, Cui YX, Shang XJ, Wang HY, Xia XY, Zhou YC, Li H, Jiang HT, Zhu WM, Huang YF. Association between ubiquitin-specific protease *USP26* polymorphism and male infertility in Chinese men. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(7–8): 545–549. [DOI]
- [71] Kim YK, Kim YS, Yoo KJ, Lee HJ, Lee DR, Yeo CY, Baek KH. The expression of *Usp42* during embryogenesis and spermatogenesis in mouse. *Gene Expr Patterns*, 2007, 7(1–2): 143–148. [DOI]
- [72] Berruti G, Ripolone M, Ceriani M. USP8, a regulator of endosomal sorting, is involved in mouse acrosome biogenesis through interaction with the spermatid ESCRT-0 complex and microtubules. *Biol Reprod*, 2010, 82(5): 930–939. [DOI]
- [73] Wright MH, Berlin I, Nash PD. Regulation of endocytic sorting by ESCRT-DUB-mediated deubiquitination. *Cell Biochem Biophys*, 2011, 60(1–2): 39–46. [DOI]
- [74] Moreno RD, Palomino J, Schatten G. Assembly of spermatid acrosome depends on microtubule organization during mammalian spermiogenesis. *Dev Biol*, 2006, 293(1): 218–227. [DOI]
- [75] Kopanja D, Roy N, Stoyanova T, Hess RA, Bagchi S, Raychaudhuri P. *Cul4A* is essential for spermatogenesis and male fertility. *Dev Biol*, 2011, 352(2): 278–287. [DOI]
- [76] Chen C, Sun X, Guo P, Dong X Y, Sethi P, Zhou W, Zhou Z, Petros J, Frierson H F Jr, Vessella RL, Atfi A, Dong JT. Ubiquitin E3 ligase WWP1 as an oncogenic factor in human prostate cancer. *Oncogene*, 2007, 26(16): 2386–2394. [DOI]
- [77] Luddi A, Margollicci M, Gambera L, Serafini F, Cioni M, De Leo V, Balestri P, Piomboni P. Spermatogenesis in a man with complete deletion of *USP9Y*. *N Engl J Med*, 2009, 360(9): 881–885. [DOI]