文章编号:1000-5404(2007)21-2023-04

论著

Muc3羧基端内SEA组件的蛋白酶切与N糖基化关系的研究

李宜成,何勇虹,彭志红,汪荣泉 (第三军医大学西南医院全军消化病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 Muc3的羧基端在翻译后经历了蛋白酶切反应,探讨Muc3的羧基端蛋白酶切反应发生是否与其羧基端内的N型糖链有关。**方法** 截断了的Muc3的羧基端(含完整的SEA组件)(p20SEA)采用定点突变方法在所要求的位点插入终止密码子,所表达蛋白质的检测采用pulse/chase和免疫共沉淀方法或SDS/PAGE和Western印迹方法,所表达蛋白质的N型糖链合成抑制采用Tunicamycin处理转染的COS-1细胞。**结果** p20表达产物(完整的Muc3羧基端产物)经历了翻译后蛋白酶切,产生30×10^3的氨基端酶切片段和49×10^3的羧基端酶切片段;Tunicamycin处理后主要的表达蛋白是60×10^3的全长的非糖基化产物,22×10^3的少量氨基端酶切片段和41×10^3的羧基端酶切片段;p20SEA表达产物(含完整的SEA组件但不含SEA组件后续氨基酸的截断Muc3羧基端)抑制N型糖链出现未酶切的36×10^3全长产物和22×10^3酶切的非N糖基化产物。**结论** 大鼠Muc3羧基端在抑制其N型糖链合成后出现Muc3的羧基端蛋白酶切的抑制。

关键词: 黏蛋白3;蛋白酶切;SEA组件;糖基化
中图法分类号: Q51; Q556.9; Q75 **文献标识码:** A

Relationship between N-linked oligosaccharides in SEA module and proteolytic cleavage within C-terminal domain of rodent Muc3

LI Yi-cheng, HE Yong-hong, PENG Zhi-hong, WANG Rong-quan (Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective The C-terminal domain of rodent Muc3 is proteolytically cleaved. This study is to explore the relationship between N-linked oligosaccharides in SEA module and the proteolytic cleavage within C-terminal domain of rodent Muc3. **Methods** Truncated rodent Muc3 C-terminal domains with complete SEA module (p20SEA) were produced by site-directed mutagenesis to insert a stop code in the required place. Proteins were detected by pulse/chase and immunoprecipitation method, or SDS/PAGE and Western blot. Inhibition of glycosylation of the expressed protein was performed by using tunicamycin. **Results** Muc3 C-terminal domain was posttranslationally cleaved to produce a V5-tagged 30 000 extracellular glycopeptide and a Myc-tagged 49 000 membrane-associated glycopeptide. Treatment with tunicamycin to transfected COS-1 cells led to the abundant production of 60 000 uncleaved and whole-length Muc3 C-terminal domain, the 30 000 N-terminal fragment shifted to 22 000 and 49 000 C-terminal fragment shifted to 41 000 after deglycosylation. The truncated Muc3 C-terminal domain containing complete SEA module but without the following residues led to production of 36 000 uncleaved and whole-length protein, and 30 000 cleaved product shifted to 22 000 after deglycosylation. **Conclusion** Proteolytic cleavage in both complete rodent C-terminal domain and complete SEA module without the following residues were partially inhibited by tunicamycin.

Key words: Mucin 3; proteolytic cleavage; SEA module; glycosylation

黏蛋白Muc3是一种细胞膜相关性黏蛋白,它与MUC4、MUC12、MUC13和MUC17[1]等细胞膜上的黏蛋白相似,有某些共同结构特点。人MUC1羧基末端发生的蛋白酶切[2],允许其可溶成分从细胞膜上释放出去。这样看来,黏蛋白可溶分子的产生机制既包括mRNA不同剪接机制,也包括蛋白质翻译后的酶切。我们已经证实啮齿类动物黏蛋白Muc3的SEA组件在翻译后经历了蛋白酶切,并证实酶切的位点位于SEA组件的LSKGSIVV基元的GS之间[3]。有报道蛋白酶切反应可以被分子内的N型糖链所影响[4-6],而Muc3

基金项目: 国家自然科学基金(30300121,30470401)
Surported by the National Natural Science Foundation of China (30300121, 30470401)
作者简介: 李宜成(1971-),男,四川省资中县人,硕士研究生,主管技师,主要从事肠黏蛋白方面的研究。电话:(023)68765191
通讯作者: 汪荣泉,电话:(023)68754124,E-mail: rongquanw@hotmail.com
收稿日期: 2007-05-11;**修回日期:** 2007-09-27

的羧基端存在8个N-糖基化位点，其中7个N-糖基化位点位于SEA组件内，揭示该7个N-糖基化位点是否影响我们所报道的Muc3的SEA组件的蛋白酶切是本研究的目的，同时也可以探讨Muc3羧基端内N型糖链的生物学意义。

1 材料与方法

1.1 化学制品

蛋白酶抑制剂鸡尾酒片、NBT/BCIP购自Roche Molecular Biochemicals。Nonidet P40（NP40）购自ICN Biomedicals Inc.，DMEM和无蛋氨酸和半胱氨酸的DMEM，Opti-MEM® I（含少量血清）、胎牛血清（FBS）、青霉素、链霉素和脂质体转染试剂盒购自Life Technologies Inc.。质粒载体pSecTag2/HygroA（pSec）购自Invitrogen公司。PVDF膜购自Millipore公司。Tunicamycin购自Sigma公司。

1.2 抗体

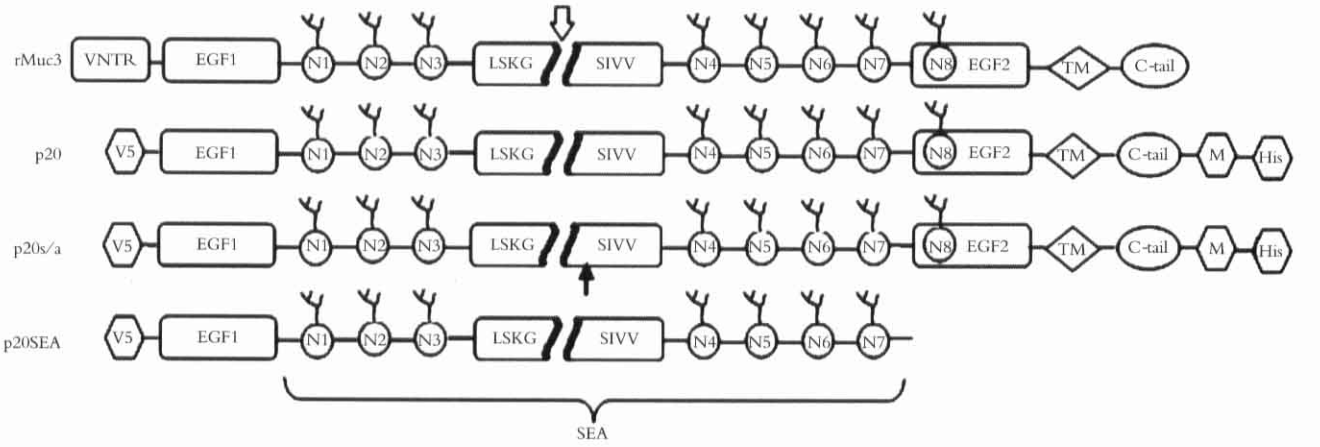
抗Myc和抗V5的单克隆抗体购自Invitrogen公司。碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠抗体，碱性磷酸酶标记的羊抗兔IgG购自Bio-Rad实验室。

1.3 rMuc3羧基末端表达载体的构建（p20，p20s/a和p20SEA）

表达载体pSec的多克隆位点插入rMuc3的羧基末端380个氨基酸所对应的cDNA。这一载体包含鼠类免疫球蛋白κ链的信号肽序列，在3′末端有一个Myc表位和一个多组氨酸序列。具体构建过程详见文献[3]。p20SEA的构建：使用Quikchange™定点突变试剂盒（Stratagene）在特定的位置插入终止密码子。p20SEA的构建是在Muc3羧基端的第228个氨基酸位置插入终止密码子，产生p20SEA的正义引物是5′- CTGTGTCACGCCTTAATGTTCATCAGGC-3′，反义引物是5′- GCCTGATGAACATTAAGGCGTGACACA- 3′。测序验证DNA突变。p20s/a的构建是将酶切基元LSKGSIVV突变为LSKGAIVV（图1）。

1.4 细胞培养和DNA转染

含10% FBS的DMEM中培养COS-1细胞。在Opti-MEM® I中使用2 μg的质粒和10 μl脂质体转染试剂进行DNA转染。以空白载体单独转染作为对照。在转染混合物中孵育细胞5 h，然后换新培养基，且孵育过程持续40 h，第16小时更换培养基。



VNTR：可变数目的末端重复序列；TM：跨膜区；C-tail：细胞质区；V5：V5标签；M：Myc标签；His：His标签；N：天冬酰胺；SEA：SEA组件；⇩：酶切位点；↑：所示为S突变成的A；Y：N型糖链；LSKG/SIVV：酶切基序

图1 rMuc3、p20、p20s/a、p20SEA结构模式图

1.5 表达蛋白的代谢标记和免疫沉淀反应

在转染期（40 h）末，COS-1细胞以^{35}S-Pro-mix脉冲标记15 min，并在无标记物的细胞培养液中追踪0或2 h，不同的是无标记物的细胞培养液含有0.24 mg/ml的半胱氨酸和0.15 mg/ml的蛋氨酸。细胞在300 μl的RIPA缓冲液中溶解、离心，而上清液用50 μl的蛋白A琼脂预清除。特殊的蛋白产物在50μl蛋白A琼脂（对于抗V5抗体）或蛋白G琼脂（对于抗Myc抗体）存在的情况下，在4 ℃的16 h孵育期间进行免疫沉淀。免疫沉淀反应产物在RIPA缓冲液中洗涤2次并在10 mmol/L的Tris盐酸缓冲液（pH 7.4，含0.1% NP-40）中洗涤1遍，接着用于SDS/PAGE。得出的凝胶再用蒸馏水冲洗，在30%的甲醇/10%醋酸中固定，抽干并在X线胶片（Kodak X-Omat XAR-5）上旷置1～3 d。

1.6 SDS/PAGE和Western blot分析

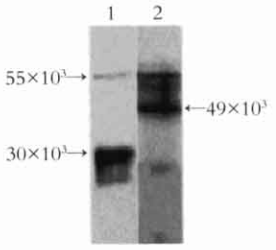
每个培养皿中收集细胞上清2 ml，将其与完全蛋白酶抑制剂混合，4 ℃ 500×*g*离心5 min，上清液渗透浓缩到其原来体积的10%。细胞经PBS洗涤并在200 μl的SDS样本缓冲液中溶解。细胞溶解物或培养上清煮沸3 min（还原条件或非还原条件下），4%～20%梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳，然后转移到immobilon-P膜。用抗Myc或抗V5抗体4 ℃下孵育过夜，1∶3 000碱性磷酸酶标记羊抗小鼠IgG稀释液在室温下反应1 h。NBT/BCIP底物检测。Seeblue™ plus 2为相对分子质量标准。

2 结果

2.1 Muc3完整的羧基端产物在表达细胞内经历了翻译后的蛋白酶切

表达整个大鼠Muc3羧基末端380个氨基酸的p20表达载体（图1），转染COS-1细胞并表达，细胞溶解产物用于SDS/PAGE和Western蛋白印迹。如图2所示，用抗V5抗体检测细

胞溶解产物，2 个免疫反应条带出现在 55×10^3 和 49×10^3 处；用抗 Myc 抗体检测细胞溶解产物，2 个免疫反应条带出现在 55×10^3 和 30×10^3 处。55×10^3 的蛋白质是全长的大鼠 Muc3 羧基末端产物，即未被蛋白质酶切的表达产物。30×10^3 的蛋白只能被抗 V5 抗体所检测，说明其是大鼠 Muc3 羧基末端表达蛋白的氨基端部分产物。49×10^3 的蛋白只能被抗 Myc 抗体所检测，说明其是大鼠 Muc3 羧基末端表达蛋白的羧基端部分产物。这说明大鼠 Muc3 羧基末端表达蛋白经历了蛋白质的酶切过程。

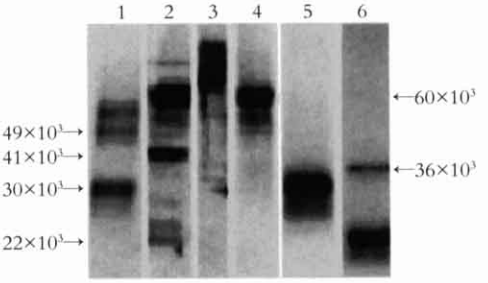


1：转染 p20 的 COS-1 细胞裂解产物用抗 V5 抗体检测；2：用抗 Myc 抗体检测（myc 列）

图 2　p20 在 COS-1 细胞的表达结果

2.2　抑制 N 糖基化部分抑制 Muc3 完整的羧基端产物的蛋白酶切的发生

表达整个大鼠 Muc3 羧基末端 380 个氨基酸的 p20 表达载体，转染 COS-1 细胞过程中用 N 糖基化的抑制剂 tunicamycin 处理细胞。理论上 tunicamycin 可以一定程度上抑制所转染细胞内所有新合成的蛋白质的 N 型糖链的合成，包括转染 p20 表达载体所表达的大鼠 Muc3 羧基末端产物。如图 3 的列 2 所示，转染 p20 表达载体的 COS-1 细胞用 tunicamycin 处理后，主要的产物是 60×10^3 的全长的未酶切 Muc3 羧基末端，其中的 41×10^3 产物是少部分酶切的羧基端的脱糖基的片段，22×10^3 产物是少部分酶切的氨基端的脱糖基的片段；如未用 tunicamycin 处理，如图 3 的列 1 所示，酶切的羧基端片段的相对分子质量是 49×10^3，酶切的氨基端片段的相对分子质量是 30×10^3，主要的产物是酶切片段的产物，55×10^3 的全长未酶切产物仅占少量的部分。上述的结果提示 tunicamycin 处理细胞可以明显地抑制 Muc3 羧基末端的蛋白酶切的发生。



1：p20 −；2：p20 +；3：p20s/a −；4：p20s/a +；5：p20SEA −；6：p20SEA +；其中 + 和 − 代表是否用 Tunicamycin 处理细胞

图 3　Tunicamycin 对 p20，p20s/a 和 p20SEA 在 COS-1 细胞内转染表达产物的影响

2.3　Tunicamycin 抑制 Muc3 羧基端产物蛋白酶切阴性突变体的 N 型糖链发生

p20s/a 是将 Muc3 羧基末端的蛋白酶切的基元 LSKGSIVV 突变为 LSKGAIVV（图 1），我们已经证实该突变可以完全阻止 Muc3 羧基末端的蛋白酶切的发生。如图 3 的列 3 所示，p20s/a 转染 COS-1 细胞后如未用 tunicamycin 处理，其表达产物的相对分子质量为（60 ~ 80）$\times10^3$，其原因是 p20s/a 的表达产物的糖基化程度不同所导致。但是用 tunicamycin 处理后，如图 3 的列 4 所示，其表达产物的相对分子质量位于 60×10^3，说明 tunicamycin 处理已经完全抑制了 Muc3 羧基末端的 N 糖基化。这种用 tunicamycin 处理所得到的 60×10^3 的未酶切产物与 p20 转染用 tunicamycin 处理后所得到的未酶切的全长片段的相对分子质量完全一致，进一步证实 p20 转染 COS-1 细胞用 tunicamycin 处理抑制了 Muc3 羧基末端的蛋白酶切的发生。

2.4　抑制 N 糖基化轻度抑制 Muc3 羧基端完整 SEA 组件（不包括 SEA 组件的后续氨基酸）的蛋白酶切的发生

p20SEA 在 COS-1 细胞内的表达产物是一种分泌性蛋白质，包括完整 SEA 组件的氨基端的所有氨基酸，但是不包括 SEA 组件的后续氨基酸，即不包括 Muc3 羧基末端结构域内的第 2 个表皮生长因子、跨膜序列和细胞质内的结构（图 1）。如图 3 的列 5 所示，转染 p20SEA 的 COS-1 细胞的培养上清用抗 V5 抗体免疫沉淀，产物的相对分子质量是 30×10^3，与转染 p20 的氨基端酶切片段的相对分子质量完全一致，理论上如果 p20SEA 未发生蛋白酶切，其表达产物的相对分子质量应该是 39.1×10^3，所以 p20SEA 在 COS-1 细胞内的表达产物同样经历了蛋白酶切。如图 3 的列 6 所示，用 tunicamycin 处理后，p20SEA 在 COS-1 细胞内的表达产物是 36×10^3 和 22×10^3，36×10^3 是 p20SEA 在 COS-1 细胞内未糖基化的表达产物，并且是未酶切的全长片段，22×10^3 与转染 p20 的未糖基化氨基端酶切片段的相对分子质量完全一致，说明其为 p20SEA 酶切产物的未糖基化成分。但是 22×10^3 是 p20SEA 在 tunicamycin 处理后的主要成分，未酶切的 36×10^3 产物量较少，所以 tunicamycin 处理可以轻度抑制 p20SEA 的酶切发生，其抑制效率明显低于 Muc3 完整的羧基端产物的蛋白酶切。具体原因有待进一步的研究。

3　讨论

膜性黏蛋白的功能不仅覆盖及保护黏膜的顶端上皮表面，还涉及通过分子细胞质内片段所产生的信号转导，依据主要来源于 MUC1、MUC3 和 MUC4 这些细胞膜上的黏蛋白与肿瘤发生和转移之间存在的联系[7,8]。尽管这些联系已经有较多的实验依据，但它们在正常细胞内的确切功能尚不甚清楚。膜性黏蛋白是属于包含 SEA 组件的蛋白质的范畴，尽管 SEA 组件序列的同源性不明显，但是 80 ~ 110 个氨基酸的 SEA 组件内保守的蛋白酶切位点（G/SVVV）和其 α 螺旋和 β 片层为其明显的特点。这样不同蛋白质的 SEA 组件在结构上是具有一定同源性的结构域。

除 MUC4 以外的细胞膜上黏蛋白，包括 MUC1、

Muc3、MUC3、MUC12 和含 7 个跨膜螺旋的非黏蛋白的 Ig-Hepta 均在蛋白质翻译后在分子靠跨膜区的 SEA 组件内经历蛋白酶切反应。MUC17 和 MUC16 也含有相似的酶切基元，它们已被证实存在类似的 SEA 组件蛋白酶切过程。

众所周知，膜型黏蛋白是一个高度糖基化的糖蛋白，其糖链主要是 VNTR 内的 O 糖苷型糖链和羧基端内的 N 糖苷型糖链。大鼠 Muc3 分子羧基端存在 8 个理论推测的 N 糖苷型糖链（N 糖基化位点[N-X-T(或 S)]），而第 8 个 N 糖苷型糖链位于第 2 个表皮生长因子的结构域内（EGF2），我们已经证实不包括第 8 个 N 糖苷型糖链的 Muc3 羧基端蛋白产物（p20SEA）仍能在内质网内经历蛋白酶切反应，酶切后的两个片段仍能紧密地连接在一起。所以说第 8 个 N 糖苷型糖链并不参与 Muc3 羧基端的蛋白酶切反应，其原因可能与第 8 个 N 糖苷型糖链并不位于赋予该分子酶切反应发生所必须的 SEA 组件内有关。而另外 7 个 N 糖苷型糖链均位于 SEA 组件内，而密集于该 SEA 组件内的 7 个 N 糖苷型糖链的生物学意义并不明确，是否涉及我们鉴定的 SEA 组件蛋白酶切的发生并不清楚。我们探讨 Muc3 羧基端内的 N 糖苷型糖链是否参与 Muc3 羧基端的蛋白酶切反应。

我们应用 N 糖苷型糖链合成的抑制剂 tunicamycin 处理转染了 p20，p20s/a（蛋白酶切阴性突变体）和 p20SEA 的 COS-1 细胞，发现 Muc3 羧基端产物的蛋白酶切反应绝大部分被抑制，p20 的非酶切及无糖化的 60×10^3 蛋白产物与 p20s/a 的无蛋白酶切的 60×10^3 蛋白产物完全一致，但少部分 p20 蛋白产物仍被酶切产生 41 和 22×10^3 的两个产物，其相对分子质量低于无 tunicamycin 处理的 49 和 30×10^3 的 p20 蛋白酶切产物。该实验结果只能有两种解释：①大鼠 Muc3 SEA 组件内 7 个 N 糖苷型糖链是这一酶切反应所必需的，它们可能作为我们所未知的蛋白酶的连接的靶位，进而在 G/SIVV 位点催化蛋白酶切的发生；②tunicamycin 广泛地抑制转染细胞内所有蛋白上的 N 糖苷型糖链，这包括我们所未知的蛋白酶（可能也是一种 N 型糖蛋白）和其他一些该蛋白酶切发生所需要的未知蛋白质。为了明确其中的确切机制及 Muc3 羧基端内 N 糖苷型糖链的生物学意义我们正对 Muc3 羧基端内 N 糖苷型糖链进行突变分析，如 SEA 组件内的 7 个 N 糖苷型糖链不存在时，SEA 组件的蛋白酶切部分或完全消失，说明该 7 个 N-糖苷型糖链是该蛋白酶切的另一个必要条件，它们可能作为蛋白酶切的丝氨酸蛋白酶的附着靶位。

Macao[9] 和 Levitin 等[10] 几乎同时发表了 MUC1 分子的 SEA 组件的蛋白酶切事件是一种蛋白质的自身酶切反应，从同源性角度推测 Muc3 的 SEA 组件的酶切反应也可能是一种自酶切机制所导致（我们正从事该方面的研究），如果 Muc3 的 SEA 组件的酶切反应是自酶切所致，应该不会涉及外源性的蛋白酶。这样 tunicamycin 影响 p20 和 p20SEA 的蛋白酶切效率，可能是其影响了 Muc3 SEA 组件内 7 个 N 糖苷型糖链的合成，进而影响了蛋白酶切的发生。这在其他蛋白质的研究中也有类似的发现[4-6]，这种现象可能说明部分的 N 型糖链的功能。

参考文献：

[1] Gum J R, Jr., Crawley S C, Hicks J W, *et al*. MUC17, a novel membrane-tethered mucin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 291(3): 466-475.

[2] Parry S, Silverman H S, McDermott K, *et al*. Identification of MUC1 proteolytic cleavage sites *in vivo*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 283(3): 715-720.

[3] 汪荣泉，房殿春. 肠黏蛋白 Muc3 羧基末端翻译后蛋白酶切过程的鉴定[J]. 中华消化杂志，2006，28(8)：549-550.

[4] Schowalter R M, Smith S E, Dutch R E. Characterization of human metapneumovirus F protein-promoted membrane fusion: critical roles for proteolytic processing and low pH[J]. J Virol, 2006, 80(22): 10931-10941.

[5] Eichler R, Lenz O, Garten W, *et al*. The role of single N-glycans in proteolytic processing and cell surface transport of the Lassa virus glycoprotein GP-C[J]. Virol J, 2006, 3: 41.

[6] Barinka C, Sacha P, Sklenar J, *et al*. Identification of the N-glycosylation sites on glutamate carboxypeptidase II necessary for proteolytic activity[J]. Protein Sci, 2004, 13(6): 1627-1635.

[7] Glickman J N, Blount P L, Sanchez C A, *et al*. Mucin core polypeptide expression in the progression of neoplasia in Barrett's esophagus [J]. Hum Pathol, 2006, 37(10): 1304-1315.

[8] Paulsen F P, Varoga D, Paulsen A R, *et al*. Prognostic value of mucins in the classification of ampullary carcinomas[J]. Hum Pathol, 2006, 37(2): 160-167.

[9] Macao B, Johansson D G, Hansson G C, *et al*. Autoproteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin[J]. Nat Struct Mol Biol, 2006, 13(1): 71-76.

[10] Levitin F, Stern O, Weiss M, *et al*. The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain[J]. J Biol Chem, 2005, 280(39): 33374-33386.

（编辑 汪勤俭）