

三孢布拉霉 CrgA 泛素连接酶功能的初步探究

杨佳敏¹, 杨培龙^{2,3}, 曲音波⁴, 余晓斌¹, 罗 玮^{*1}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 21422; 2. 农业农村部 饲料生物技术重点实验室, 北京 10008; 3. 中国农业科学院 饲料研究所, 北京 10008; 4. 山东大学 微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 266237)

摘要: CrgA 已经被证实是三孢布拉霉和一些其他丝状真菌中类胡萝卜素生物合成的一个负调控因子。环指结构域的存在表明, CrgA 可能具有泛素连接酶的功能, 是泛素化调节系统中的一个关键酶。为了验证这一假设, 从三孢布拉霉中分离并鉴定了一种泛素激活酶(BtE1)和 18 种假定的泛素结合酶(UBC)。生物信息学分析表明, 18 种 UBC 蛋白质都包含一个 UBC 的保守结构域, 表明它们都属于泛素结合酶。系统发育关系分析表明, 18 个 UBC 蛋白质属于 7 个蛋白质亚家族。根据系统进化分析结果筛选出 6 种候选 UBC 蛋白质, 通过异源表达及亲和纯化得到 BtE1、6 种 BtUBC 蛋白质、BtCrgA 和 BtWC-1b, 并在体外进行泛素化反应, BtCrgA 能在 BtE1 和 BtUBC D 的协助下完成对自身的泛素修饰功能。

关键词: CrgA; 泛素连接酶; 泛素活化酶; 泛素结合酶; 体外泛素化

中图分类号: Q 781 文章编号: 1673-1689(2024)02-0081-08 DOI: 10.12441/spyswjs.20211220002

Preliminary Study on the Function of Ubiquitin Ligase of CrgA Protein from *Blakeslea trispora*

YANG Jiamin¹, YANG Peilong^{2,3}, QU Yinbo⁴, YU Xiaobin¹, LUO Wei^{*1}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Feed Biotechnology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of People's Republic of China, Beijing 10008, China; 3. Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 10008, China; 4. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, China)

Abstract: CrgA has been identified as a negative regulator of the carotenoid biosynthesis in *Blakeslea trispora* and some other zygomycetes. The presence of the ring finger domains suggest that CrgA may function as an ubiquitin ligase, a key enzyme in the ubiquitination regulation system. In order to test this hypothesis, one ubiquitin activating enzyme (BtE1) and 18 putative ubiquitin-conjugation enzymes (UBC) from *B. trispora* were isolated and identified. Bioinformatics analysis indicated that each of the 18 UBC proteins contained a conserved domain of UBC, indicating that all of them belong to ubiquitin binding enzymes. Phylogenetic relationship analysis showed that 18 UBC proteins belong to 7 protein subfamilies, homologous with those of

收稿日期: 2021-12-20 修回日期: 2022-01-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(21878123); 农业农村部饲料生物技术重点实验室开放课题(KLFB-FRI-202001); 微生物技术国家重点实验室开放课题(M2020-06)。

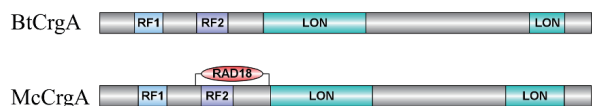
* 通信作者: 罗 玮(1981—), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事微生物代谢工程和发酵工程研究。E-mail: wlue@jiangnan.edu.cn

Saccharomyces cerevisiae. 6 candidate UBC proteins were screened based on phylogenetic analysis, and BtE1, 6 BtUBC proteins, BtCrgA and BtWC-1b were obtained by heterologous expression and affinity purification, which were ubiquitinated *in vitro*. BtCrgA can perform ubiquitin modification function on itself with the assistance of BtE1 and BtUBC D.

Keywords: CrgA, ubiquitin ligase, ubiquitin activating enzyme, ubiquitin binding enzyme, *in vitro* ubiquitination reaction

类胡萝卜素作为一种天然色素,在抗衰老、抗肿瘤、增强免疫功能等方面均能发挥重要功效。利用微生物发酵生产 β -类胡萝卜素是较为经济、安全的生产方法,而三孢布拉霉(*Blakeslea trispora*)具有生物量大、产量高、生长迅速、不受环境影响等诸多优势,是工业上大规模生产 β -类胡萝卜素的理想菌株^[1]。

CrgA 起初是在卷枝毛霉中发现的,是一种在类胡萝卜素生物合成的光诱导途径中发挥重要作用的负调节因子^[2]。在藤仓镰孢(*Fusarium fujikuroi*)^[3]、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)^[4]、三孢布拉霉^[5]和布拉克须霉(*Phycomyces blakesleeanus*)^[6]中也都鉴定到了同源基因。在卷枝毛霉中 *crgA* 基因的表达是由光脉冲活化的,且其进程均与类胡萝卜素合成的结构基因相似。在卷枝毛霉中敲除 *crgA* 基因会导致在黑暗中类胡萝卜素的大量积累,参与类胡萝卜素合成的结构基因 *carB* 基因和 *carRP* 基因在黑暗和光照条件下均被活化表达^[7],表明 CrgA 可能作为一种与 *carB* 和 *carRP* 基因合成有关的负调控因子参与类胡萝卜素的合成。McCrgA 和 BtCrgA 都含有 2 个环指结构域和不完整的 LON 结构域,见图 1。环指结构域的存在显示其具有泛素连接酶活性。Silva 等的研究显示,McCrgA 参与 MCWC-1b 的非降解型的单泛素化和双泛素化修饰,导致 MCWC-1b 失活但并不降解,在黑暗中 CrgA 则通过单泛素化和双泛素化 MCWC-1b 使其失活^[8],影响了调控因子进而抑制类胡萝卜素的合成。



RF1: 环指结构域 1; RF2: 环指结构域 2; RAD 18: RAD18 超家族; 两个 LON: 同一个不完整的 LON 结构域。

图 1 McCrgA 及 BtCrgA 结构示意图

Fig. 1 Strudure representation of McCrgA and BtCrgA

三孢布拉霉 *crgA* 基因导入卷枝毛霉的 *crgA* 缺陷型菌株后产生了相同的光诱导和光适应现象,表明 CrgA 参与的调节机制在这些真菌之间基本保守,三孢布拉霉中 CrgA 的调节机制可能与卷枝毛霉相似^[5]。巩尊洋等构建了三孢布拉霉的 *crgA* 缺陷型突变株并对其进行研究,发现缺陷型菌株中参与类胡萝卜素合成的 3 种结构基因转录显著增强,生产的类胡萝卜素水平相较于野生型提高了 31.2%^[9],因此三孢布拉霉 CrgA 同样也是作为一种负调控因子调节类胡萝卜素的相关合成,且在功能上可能与卷枝毛霉 CrgA 相似,其对类胡萝卜素合成的调控可能也是通过对 WC-1b 蛋白的泛素化的调控进而影响类胡萝卜素的合成。

由于目前三孢布拉霉遗传转化操作困难,三孢布拉霉类胡萝卜素合成机制的解析也较为困难,在已知 BtCrgA 作为类胡萝卜素合成的负调控因子的情况下,作者尝试通过异源表达及体外检测对 BtCrgA 参与的机制进行初步分析,期望通过基因挖掘和生物信息学分析三孢布拉霉泛素化相关酶的基本性质,并获得体外泛素化反应候选酶,通过异源表达、亲和纯化及体外泛素化来构建 BtCrgA 的体外泛素化反应体系,以寻找能协助 BtCrgA 实现泛素连接酶功能的相关酶,确定 BtCrgA 的泛素连接酶功能并探究其是否能实现对 BtWC-1b 的泛素化,进而从体外实现对 CrgA 部分功能的探究,为解析 CrgA 在三孢布拉霉菌体内的功能及对类胡萝卜素合成中的负调节作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 三孢布拉霉 (*Blakeslea trispora*) NRRL 2896 (-)、*Escherichia coli* BL21 (DE3): 作者所在实验室保藏菌株,表达载体为 pET-28a。

1.1.2 试剂 真菌总 RNA 抽提纯化试剂盒、硫酸卡那霉素:生工生物(上海)有限公司;HiFiScript gDNA Removal RT MasterMix、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒:康为世纪生物科技有限公司;质粒提取、DNA 产物纯化试剂盒:天根生化科技(北京)有限公司;泛素兔单克隆抗体:武汉爱博泰克生物科技有限公司;0.2 μ m PVDF 膜、Myc 抗体(小鼠单抗)、Flag 抗体(小鼠单抗)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG:上海碧云天生物技术有限公司;DNA marker、*Bam*H I 限制性内切酶、*Sac* I 限制性内切酶:Takara 公司;蛋白质预染 marker、2 \times Phanta Max Master Mix、ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit、高敏型 ECL 化学发光检测试剂盒:诺唯赞生物科技股份有限公司;其他试剂:国药集团药业股份有限公司;引物合成、基因合成及测序均由苏州金唯智公司完成。

1.2 方法

1.2.1 泛素化相关因子基因挖掘 利用真菌总 RNA 提取试剂盒提取三孢布拉霉 NRRL 2896(-)总 RNA。利用 HiFiScript gDNA Removal RT MasterMix 反转录获得 cDNA。

根据卷枝毛霉 E1 (EPB87762) 氨基酸序列,从三孢布拉霉 NRRL2456 全基因组数据库(<https://mycocosm.jgi.doe.gov/pages/blast-query.js?db=Blatri1>)中的 Blast 功能得到同源蛋白质的基因位置信息,根据氨基酸序列与碱基序列对应关系初步拼接基因序列并设计引物,以三孢布拉霉 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,通过测序获得完整序列信息。

从 UbiProt 数据库(<http://ubiprot.org.ru/>)中下载酿酒酵母的所有 UBC 蛋白质序列,利用 TBTools 软件以酿酒酵母所有 UBC 蛋白质氨基酸序列与三孢布拉霉的全氨基酸序列进行比对,得到候选 E2 酶家族成员。根据候选 E2 酶的氨基酸序列与全基因组序列数据库进行比对获得基因位置信息,根据氨基酸序列与碱基序列对应关系初步拼接基因序列并设计引物。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,通过测序获得完整序列信息。

1.2.2 三孢布拉霉泛素化相关因子生物信息学分析 利用 ProtParam 预测 BtE1 的基本性质。根据基因组位置信息对所有 BtUBC 蛋白质进行重新命名,并利用 ProtParam 预测各 UBC 蛋白质基本性质。在 Euk-mPLoc 网站预测各蛋白质的亚细胞定位。利用

TBtools 的 Batch SMART 功能从 SMART 数据库批量获取各 UBC 蛋白质的保守结构,分析结果并作图。利用 MEGA7 软件对酵母 UBC 蛋白质和三孢布拉霉 UBC 蛋白质构建系统进化树。

1.2.3 重组载体构建、异源表达及纯化 以 cDNA 为模板,克隆 *BtE1*、*BtCrgA*、*BtWC-1b* 以及 *BtUBC* 基因,利用 ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit 将目的基因片段克隆到 pET-28a 载体的 *Bam*H I/*Sac* I 位点,其中 *BtCrgA* 与 *Myc* 标签融合,*BtWC-1b* 与 *Flag* 标签融合,通过热击将重组载体导入 *E.coli* BL21(DE3)。

将含有各重组载体的 *E.coli* 在 50 mL LB 液体培养过夜,接种于 TB 液体培养基中培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8,加入 0.3 mmol/L 的异丙基-D-硫代半乳糖苷(IPTG),在 16 $^{\circ}$ C、125 r/min 诱导表达 20 h。诱导后菌液经离心弃去上清液、PBS 缓冲液洗涤重悬后,超声破碎细胞,于 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,经 0.45 μ m 滤膜抽滤后,使用 Ni-NTA 进行蛋白质纯化,纯化得到的蛋白质经 SDS-PAGE 验证。

1.2.4 CrgA 泛素连接酶功能分析 参考 Honda 等^[10]的反应体系进行 CrgA 参与的泛素连接酶功能探究,30 μ L 的体外泛素化反应体系中包含了 1.5 μ L 20 \times 反应缓冲液(1 mol/L Tris-HCl、40 mmol/L ATP、100 mmol/L MgCl₂、40 mmol/L DTT、pH 7.5),加入 300 ng BtE1、300 ng BtE2、2 μ g 泛素、1 μ g BtCrgA 及 1 μ g BtWC-1b 蛋白质,30 $^{\circ}$ C 反应 2 h,加入 5 \times SDS-PAGE 上样缓冲液,煮沸 5 min,在 SDS-PAGE 凝胶上进行电泳分离,进行 Western blot 分析,将凝胶中分离的蛋白质经半干转印仪转印至 PVDF 膜,用含有质量分数 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 1 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 溶液洗涤 3 次,二抗孵育 1 h,洗涤 3 次后使用 ECL 发光检测试剂盒检测,在化学发光成像系统中进行成像。

2 结果与讨论

2.1 三孢布拉霉泛素化相关酶基因挖掘

泛素化修饰是一种重要的蛋白翻译后修饰途径,完整途径包括了泛素活化酶 E1 (ubiquitin-activating enzyme, UBA)、泛素结合酶 E2 (ubiquitin-conjugation enzyme, UBC) 和泛素连接酶 E3 (ubiquitin-protein ligase)^[11],要实现对 BtCrgA 泛素

连接酶功能的体外探究,首先需要获得泛素活化酶及泛素结合酶的相关序列信息。

根据卷枝毛霉已报道的泛素活化酶序列以及三孢布拉霉全基因组信息设计引物,以三孢布拉霉 cDNA 为模板进行扩增,得到全长约为 3 000 bp 的

条带,与预期结果一致,对扩增得到的序列进行测序,得到 3 030 bp 的序列,对应的氨基酸序列与卷枝毛霉 E1 酶序列同源性为 88.4%,可初步认定该蛋白为 E1 酶,将该基因命名为 *BtE1*,见图 2。

利用 TBtools 软件,以酵母已报道的泛素结合

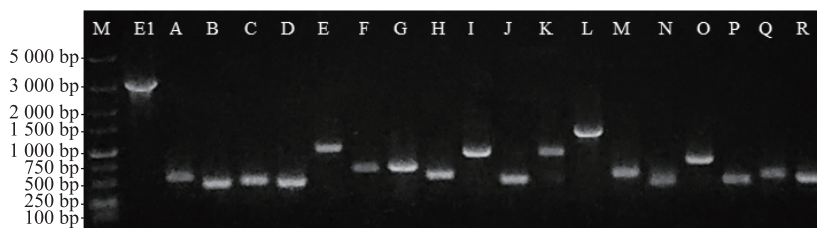


图 2 *BtE1* 及 *BtUBC* 基因编码序列核酸电泳图

Fig. 2 Nucleic acid electrophoresis of *BtE1* and *BtUBC* gene coding sequences

酶序列为模板,从三孢布拉霉基因组数据库信息中共筛选得到三孢布拉霉的 18 种 UBC 蛋白质,根据基因信息设计引物,以三孢布拉霉 cDNA 为模板进行扩增,得到不同长度的基因序列,经测序后得到 *BtUBC* 基因编码序列长度在 411~1 227 bp。

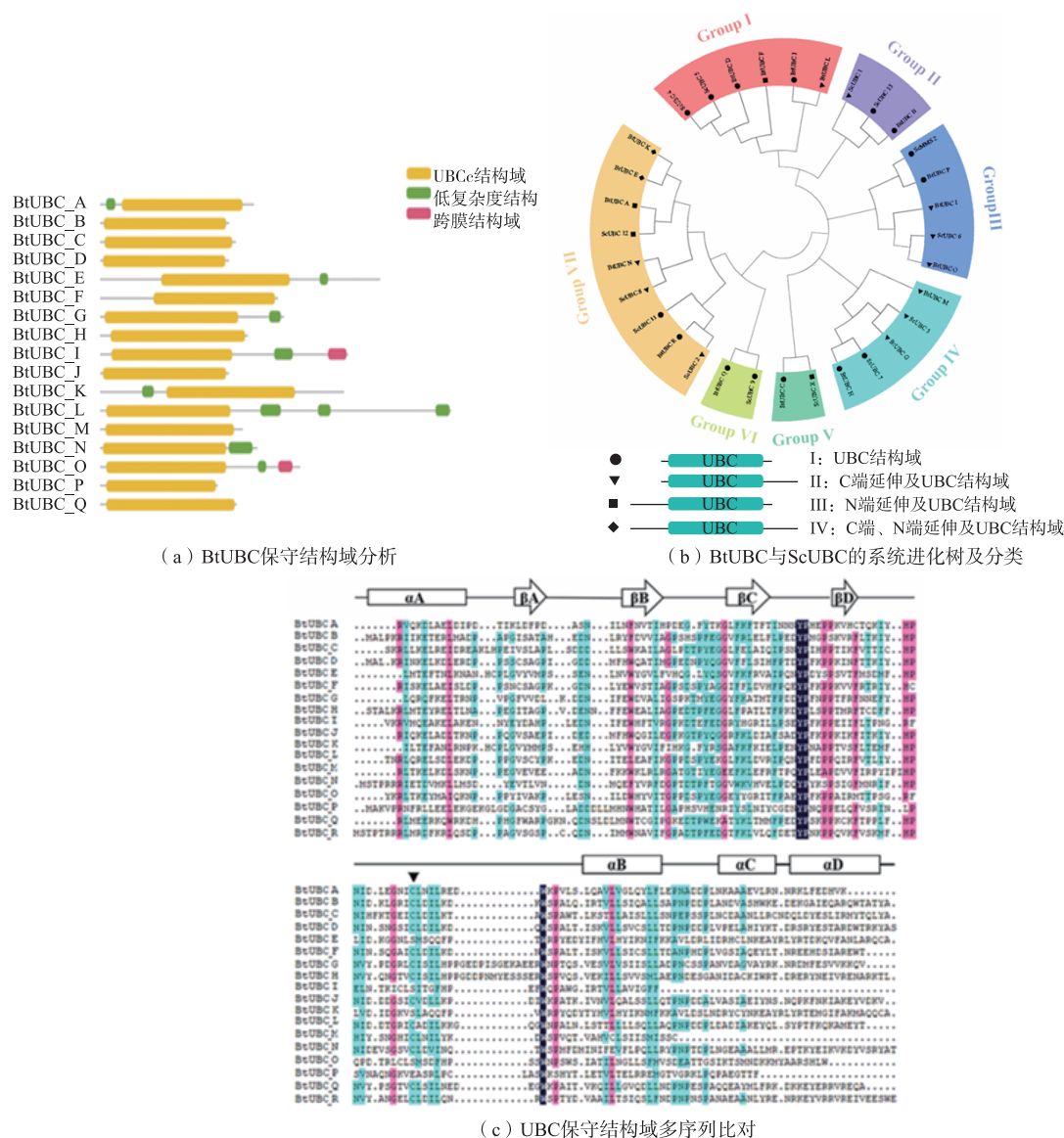
2.2 三孢布拉霉泛素化相关酶特征分析

2.2.1 泛素活化酶基本性质分析 泛素活化酶 E1,是泛素化修饰途径中的重要起始酶类,依赖 ATP 作用下激活泛素并将其转移至 E2 酶^[12]。三孢布拉霉泛素活化酶 *BtE1* 由 1 009 个氨基酸组成,蛋白质相对分子质量预测为 113 700,等电点为 5.02,为稳定性蛋白质,亚细胞定位预测显示它位于细胞质中。

2.2.2 泛素结合酶基本性质分析 泛素结合酶 E2 在泛素化途径中起到接受 E1 酶的泛素并将泛素转移给 E3 酶或底物蛋白质的作用,E2 酶的主要特征是含有高度保守的泛素结合(UBC)结构域^[13]。目前仅鉴定出三十几个物种的泛素结合酶 E2 家族成员,主要为酿酒酵母、秀丽线虫、多种植物及人类,且不同物种中的泛素结合酶 E2 数目在十几到数十个不等^[14]。而从三孢布拉霉中一共鉴定到 18 种泛素结合酶。这 18 种三孢布拉霉 UBC 蛋白质由 136~408 个氨基酸组成,蛋白质相对分子质量在 15 200 到 46 100,基因内含子数量为 1~9,蛋白质大多数位于细胞核和细胞质,少数位于细胞骨架或细胞膜上,这表明 *BtUBC* 多在细胞内环境中发挥作用。不同蛋白质的等电点不同(4.17~9.62),*BtUBC* 蛋白质均属于不稳定蛋白质,亲水性平均系数代表蛋白质的亲水性情况,除 *BtUBC C* 蛋白质外,其余蛋白质均为亲水性蛋白质。

对所有 *BtUBC* 蛋白质进行保守结构域分析,结果显示所有 *BtUBC* 蛋白质均含有 UBCc 结构域,见图 3(a)。表明这 18 种蛋白质均属于 UBC 蛋白质,在 *BtUBC A/E/G/I/K/L/N/O* 中含有一个低复杂度结构,该结构可能具有位置依赖作用,其在序列中的位置可能与蛋白质的结合特性及生物学作用有关^[15],*BtUBC I* 和 *BtUBC O* 的 N 端含有跨膜结构域。

对所有 *BtUBC* 保守结构域进行多序列比对和二级结构预测,见图 3(b)。多序列比对结果显示这些 UBC 保守结构域序列的一致性为 36.58%,二级结构预测结果显示在 UBC 保守结构域中含有 4 个 α 螺旋和 3 个 β 折叠,另外几乎所有 *BtUBC* 蛋白质中均含有泛素硫酯中间体相互作用残基和 E3 相互作用残基,大部分蛋白质含有半胱氨酸活性位点,部分蛋白质如 *BtUBC E/I/K/O/P* 则缺乏半胱氨酸活性位点,可能属于类 E2 酶,主要是与通过活性 E3 酶合作在泛素化修饰中发挥功能^[16]。对 14 个酿酒酵母和 18 个三孢布拉霉 E2 酶成员进行了系统发育分析,见图 3(c)。*BtUBC* 蛋白质与 *ScUBC* 蛋白质在进化上并不是完全对应关系,表明在进化不同物种进化过程中 UBCs 发生了不同的变化,酵母和三孢布拉霉的 E2 成员分布在 7 个亚家族中。根据结构特征,各 UBC 蛋白质又可分为 4 类(以不同标记区分),分别为仅含有 UBC 结构域的 I 类、含有 C 端延伸及 UBC 结构域的 II 类、含有 N 端衍生及 UBC 结构域的 III 类和含有 C 端、N 端延伸及 UBC 结构域的 IV 类^[17-19],在涉及的 UBC 蛋白质中,*BtUBC D/J/B/P/H/C/Q/R* 和 *ScUBC 4/5/7/9/13/MMS2* 属于 I 类,*BtUBC G/I/L/N/O* 和 *ScUBC1/2/3/6/8* 属于 II 类,



▼表示半胱氨酸活性位点。

图3 BtUBC蛋白质保守结构域分析比对及系统进化树

Fig. 3 Analysis and comparison of conserved domains of BtUBCs protein and phylogenetic tree construction

BtUBC A/F 和 ScUBC 12/X 属于 IV 类, BtUBC E/K 属于 IV 类。系统发育树上相同或相似分支的大部分 ScUBC 蛋白质和 BtUBC 蛋白质属于同一类型的 UBC, 但也有少数类型不一致, 如 ScUBC X 和 BtUBC C、ScUBC 2 和 BtUBC R。

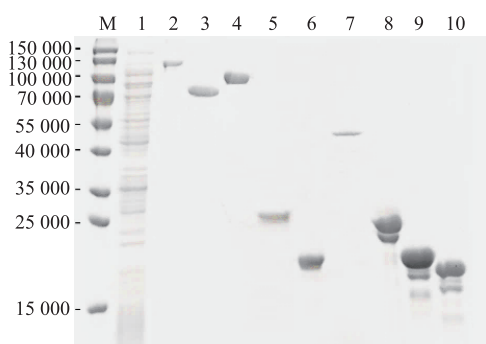
2.3 泛素化相关酶的异源表达及蛋白质纯化

Rad18 是一种泛素连接酶, 能与泛素结合酶 Rad6(UBC 2)形成复合物, 实现底物蛋白质的单泛素化修饰^[20]。McCrgA 含有的 RAD18 超家族结构表明 McCrgA 可能也属于 Rad18 这类蛋白质, 而 BtCrgA 虽然不含 RAD18, 但它与 McCrgA 有很高的

同源性, 所以考虑将与 ScUBC 2 亲缘关系较近的 BtUBC A/E/K/N/Q/R 作为候选泛素结合酶。此外, ScUBC4/5 具有强大的泛素转移活性, 可以协助各种泛素连接酶进行泛素化修饰功能^[21], 因此 BtUBC D 蛋白质也同样作为候选 E2 酶。这些 *BtUBC* 基因成功构建出重组载体, 但只有 BtUBC A、BtUBC D 和 BtUBC Q 成功实现异源表达。BtUBC E、BtUBC N 和 BtUBC R 经过密码子优化后可以在大肠杆菌中表达, 而 BtUBC K 即使经过密码子优化也无法表达。

所有能表达异源蛋白质的重组菌经培养、诱导表达、超声破碎、亲和纯化获得相应蛋白质, 并进行

SDS-PAGE 检测。其中 BtE1 蛋白质的预测相对分子质量约为 113 000, BtCrgA 蛋白质约为 70 000, BtWC-1b 蛋白质约为 85 000。BtUBC A、BtUBC D、BtUBC E、BtUBC N、BtUBC Q 和 BtUBC R 的蛋白质的相对分子质量分别为 20 300、16 900、37 500、18 400 和 17 300。SDS-PAGE 结果显示, 目标蛋白质条带出现在相应位置, BtWC-1b 蛋白质的实际大小大于预测的相对分子质量, 见图 4。



泳道 1: 含有 pET-28a 的对照组粗蛋白质; 泳道 2~10: 分别为纯化得到的 BtE1、BtCrgA、BtWC-1b、BtUBC A、BtUBC D、BtUBC H、BtUBC N、BtUBC Q、BtUBC R。

图 4 泛素化相关蛋白质纯化图

Fig. 4 Purification of ubiquitination related proteins

2.4 CrgA 泛素连接酶功能体外分析

以纯化得到的各组分进行体外泛素化反应, 经 SDS-PAGE 分离、转膜后利用泛素抗体、Myc 抗体以及 Flag 抗体检测反应情况, 结果显示在 BtUBC A/D/E/N/Q/R 这 6 种 UBC 蛋白质中, 仅有 BtUBC D 可介导 BtCrgA 发生泛素化, 但并未导致 WC-1b 发生泛素化, 可能是尚未找到能协助 CrgA 发挥对 WC-1b 蛋白质泛素化功能的 UBC 蛋白质, 可能是目前的体外泛素化条件并未达到要求等原因导致, 如某些 E2 酶就是与泛素样分子发生作用而不是与泛素分子。

为进一步确定反应的泛素化情况, 排除是 E1 酶、E2 酶泛素化反应后产生该类结果的可能, 分别设置缺乏不同成分的对照组进行体外泛素化反应和 Western Blot 检测, 结果显示当 E1、E2、E3 均存在的条件下, CrgA 能够发挥其泛素连接酶的功能, 自身会发生泛素化, 而 WC-1b 则并未受到影响, 见图 5。

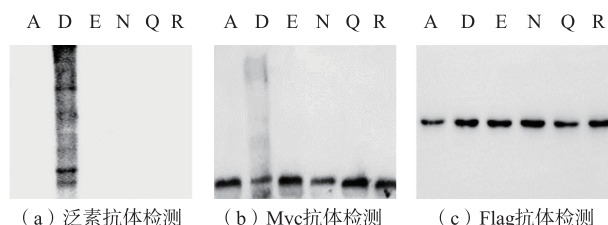


图 5 不同 UBC 蛋白质的体外泛素化反应结果

Fig. 5 In vitro ubiquitination of different UBC proteins

泛素化反应是由泛素激活酶 E1 酶起始, E1 酶在 ATP 作用下与泛素形成高能硫酯键, 活化后的泛素转移到泛素结合酶 E2 上, 最后泛素连接酶催化底物蛋白质与泛素连接^[2], 修饰形式涉及单一泛素附着(单泛素化)、几个单一泛素分子或泛素链附着(多泛素化)^[23]。在 6 种候选泛素结合酶参与的反应中, 仅有 BtUBC D 参与的反应可以导致 BtCrgA 发生泛素化修饰, 而 BtWC-1b 未受到影响, 表明在该作用下 BtCrgA 与泛素形成的连接方式可能并不适用于将泛素转移给 BtWC-1b。该反应涉及步骤大致为 BtE1 在 ATP 作用下激活泛素并与之结合, 随即泛素能够转移到 BtUBC D 上, 最后可能由于缺乏相应底物蛋白质, 或者 BtCrgA 自身可能就是一种底物蛋白质, 导致 BtCrgA 发生泛素化修饰, 形成多泛素化, 见图 6。这种对于 BtCrgA 的泛素化修饰可能与 BtCrgA 在菌体内的质量浓度及活性调节有关。

有研究表明含有环指结构域的 E3 酶通过向自身添加多聚泛素链, 进而进入降解途径或发生功能

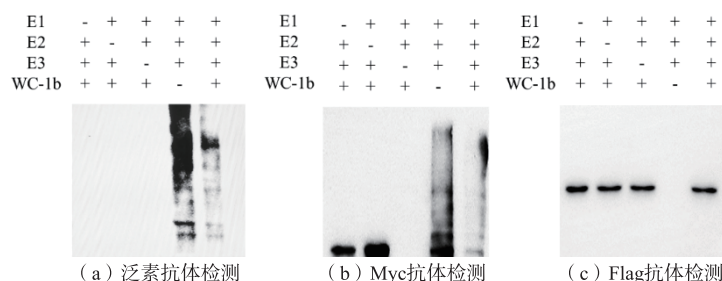


图 6 不同组分体系的泛素化反应结果

Fig. 6 Results of ubiquitination reaction of different components

的改变从而调控其作为 E3 酶的酶活力^[24],从构建的三孢布拉霉和酿酒酵母 UBC 蛋白质的系统进化树中可以发现,与 BtUBC D 蛋白质亲缘关系较近的为 ScUBC 4 和 ScUBC 5 两类蛋白质,而这两类蛋白质在酵母中往往是与不稳定的蛋白质相关^[25]。有研究显示,在野生型卷枝毛霉中,CrgA 难以被特异性抗体检测到,而在酵母中异源表达 CrgA 时同样显示出 CrgA 的不稳定性^[26],这也可能是由于这类与酵母 UBC4、UBC5 同源的 UBC 蛋白质参与到了 CrgA 的泛素化反应中,促使 CrgA 蛋白质进入 26S-蛋白酶体降解途径或其他途径导致 CrgA 的降解,从而维持了 CrgA 在菌体内的极低水平。因此,BtUBC D 也可能只直接介导了 BtCrgA 的自泛素化而不用将泛素再转移至其他底物蛋白质,这对于维持 CrgA 在菌体内的水平可能具有重要意义。而关于 BtCrgA 对 BtWC-1b 的泛素化作用,目前仍未得到验证,可能是由于缺乏必要的泛素化反应条件才导致无法实现该反应,见图 7。

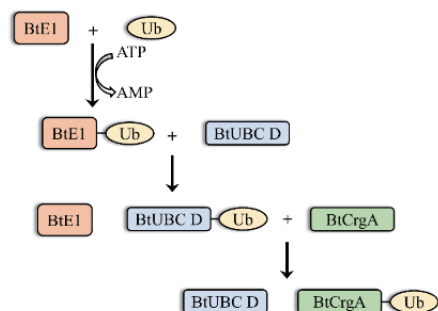


图 7 BtCrgA 泛素化修饰示意图

Fig. 7 Schematic diagram of BtCrgA ubiquitination modification

3 结 语

作者基于基因组数据挖掘,从三孢布拉霉中发现了一种泛素活化酶和 18 种泛素结合酶,利用生物信息学分析了泛素活化酶和泛素结合酶的基本性质,对三孢布拉霉 UBC 蛋白质和酿酒酵母 UBC 蛋白质构建系统进化树发现,该家族中的蛋白质分属于 7 种蛋白质亚家族,并筛选出 6 种 BtUBC 蛋白质作为候选基因构建体外泛素化反应体系。通过基因克隆和基因合成在 *E.coli* 中实现了 BtE1、6 种 BtUBC、BtCrgA 以及 BtWC-1b 的异源表达。通过不同 UBC 蛋白质参与的体外泛素化反应,最终检测到 BtUBC D 蛋白质能够实现对 BtCrgA 的泛素化修饰。通过不同组分泛素化反应体系的检测结果显示,只有当 E1、E2、E3 均存在的条件下,才能检测到 CrgA 的泛素化,验证了 CrgA 的泛素连接酶功能。BtUBC D 蛋白质与 ScUBC 4 以及 ScUBC 5 同源,这可解释 CrgA 在菌体内的不稳定性及极低的含量,在这个泛素化反应体系中,泛素经泛素激活酶 BtE1 活化后转移给泛素结合酶 BtUBC D,最后转移至泛素连接酶 BtCrgA 上,导致 BtCrgA 发生了泛素化修饰。目前的研究尚未实现对 BtWC-1b 泛素化,或可通过构建三孢布拉霉的 *crgA* 缺陷型菌株来从体内探究 CrgA 与 WC-1b 之间的关系,从而进一步解析三孢布拉霉类胡萝卜素的合成机制。另外也可构建 *crgA* 突变型的三孢布拉霉菌株以探究 CrgA 的关键性结构域对于三孢布拉霉合成类胡萝卜素的影响,以期解析类胡萝卜素合成机制以及提高类胡萝卜素产量提供部分依据。

参考文献:

- [1] 丁长河,尹萌,李鸿莉.三孢布拉氏霉菌发酵产 β -胡萝卜素工艺优化[J].食品研究与开发,2020,41(16):188-194.
DING C H,YIN M,LI H L. Study on the optimization of β -carotene production by fermentation of *Blakeslea trispora*[J]. **Food Research and Development**,2020,41(16):188-194. (in Chinese)
- [2] NAVARRO E,RUIZ-PÉREZ V L,TORRES-MARTÍNEZ S. Overexpression of the *crgA* gene abolishes light requirement for carotenoid biosynthesis in *Mucor circinelloides*[J]. **European Journal of Biochemistry**,2000,267(3):800-807.
- [3] RODRÍGUEZ-ORTIZ R,LIMÓN M C,AVALOS J. Functional analysis of the *carS* gene of *Fusarium fujikuroi*[J]. **Molecular Genetics and Genomics**,2013,288(3/4):157-173.
- [4] RODRÍGUEZ-ORTIZ R,MICHELSE C,REP M,et al. Genetic basis of carotenoid overproduction in *Fusarium oxysporum*[J]. **Fungal Genetics and Biology**,2012,49(9):684-696.
- [5] QUILES-ROSILLO M D,RUIZ-VÁZQUEZ R M,TORRES-MARTÍNEZ S,et al. Light induction of the carotenoid biosynthesis pathway in *Blakeslea trispora*[J]. **Fungal Genetics and Biology**,2005,42(2):141-153.
- [6] TAGUA V G,NAVARRO E,GUTIÉRREZ G,et al. Light regulates a *Phycomyces blakesleeanus* gene family similar to the

- carotenogenic repressor gene of *Mucor circinelloides*[J]. **Fungal Biology**, 2020, 124(5):338-351.
- [7] NAVARRO E, LORCA-PASCUAL J M, QUILES-ROSILLO M D, et al. A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*[J]. **Molecular Genetics and Genomics**, 2001, 266(3):463-470.
- [8] SILVA F, NAVARRO E, PEÑARANDA A, et al. A RING-finger protein regulates carotenogenesis via proteolysis-independent ubiquitylation of a white collar-1-like activator[J]. **Molecular Microbiology**, 2008, 70(4):1026-1036.
- [9] 巩尊洋. *crgA* 调控三孢布拉霉合成类胡萝卜素作用分析[D]. 无锡:江南大学, 2017.
- [10] HONDA R, TANAKA H, YASUDA H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53[J]. **FEBS Letters**, 1997, 420(1):25-27.
- [11] HERSHKO A, CIECHANOVER A, VARSHAVSKY A. The ubiquitin system[J]. **Nature Medicine**, 2000, 6(10):1073-1081.
- [12] HUANG D T, MILLER D W, MATHEW R, et al. A unique E1-E2 interaction required for optimal conjugation of the ubiquitin-like protein NEDD8[J]. **Nature Structural & Molecular Biology**, 2004, 11(10):927-935.
- [13] VAN WIJK S J L, MARC TIMMERS H T. The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s):deciding between life and death of proteins[J]. **The FASEB Journal**, 2010, 24(4):981-993.
- [14] 刘维刚. 马铃薯泛素结合酶 E2 基因家族鉴定和 StUBC9 基因克隆及功能研究[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2019.
- [15] COLETTA A, PINNEY J W, SOLÍS D Y, et al. Low-complexity regions within protein sequences have position-dependent roles [J]. **BMC Systems Biology**, 2010, 4:43.
- [16] LORICK K L, JENSEN J P, WEISSMAN A M. Expression, purification, and properties of the Ubc4/5 family of E2 enzymes[J]. **Methods in Enzymology**, 2005, 398:54-68.
- [17] MATUSCHEWSKI K, HAUSER H P, TREIER M, et al. Identification of a novel family of ubiquitin-conjugating enzymes with distinct amino-terminal extensions[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1996, 271(5):2789-2794.
- [18] PLAFKER S M, PLAFKER K S, WEISSMAN A M, et al. Ubiquitin charging of human class III ubiquitin-conjugating enzymes triggers their nuclear import[J]. **The Journal of Cell Biology**, 2004, 167(4):649-659.
- [19] 陈建明, 余应年. 真核泛素缀合途径研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(2):175-178.
CHEN J M, YU Y N. Advances of ubiquitin-conjugating pathway in eukaryotes[J]. **Chinese Journal of Pathophysiology**, 2000, 16(2):175-178. (in Chinese)
- [20] WATANABE K, TATEISHI S, KAWASUJI M, et al. Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination[J]. **The EMBO Journal**, 2004, 23(19):3886-3896.
- [21] STOLL K E, BRZOVIC P S, DAVIS T N, et al. The essential Ubc4/Ubc5 function in yeast is HECT E3-dependent, and RING E3-dependent pathways require only monoubiquitin transfer by Ubc4[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2011, 286(17):15165-15170.
- [22] FINLEY D, ULRICH H D, SOMMER T, et al. The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Genetics**, 2012, 192(2):319-360.
- [23] HAGLUND K, STENMARK H. Working out coupled monoubiquitination[J]. **Nature Cell Biology**, 2006, 8(11):1218-1219.
- [24] AMEMIYA Y, AZMI P, SETH A. Autoubiquitination of BCA2 RING E3 ligase regulates its own stability and affects cell migration[J]. **Molecular Cancer Research:MCR**, 2008, 6(9):1385-1396.
- [25] SEUFERT W, JENTSCH S. Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins[J]. **The EMBO Journal**, 1990, 9(2):543-550.
- [26] MURCIA-FLORES L, LORCA-PASCUAL J M, GARRE V, et al. Non-AUG translation initiation of a fungal RING finger repressor involved in photocarotenogenesis[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2007, 282(21):15394-15403.