遗传发育所建立多亚基SCF E3连接酶的体外重组系统

作者：writer 来源：中国科学院

本文原地址：https://www.iikx.com/news/progress/19037.html

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

蛋白质合成与降解间的平衡，对于维持细胞内稳态及机体的正常功能具有重要作用。泛素-蛋白酶体途径是真核细胞中蛋白降解的主要途径之一，目标蛋白的泛素化修饰由泛素活化酶（E1）、泛素结合酶（E2）和泛素连接酶（E3）协同完成。SCF（SKP1/Cullin1/F-box）E3连接酶是一类多亚基RING E3连接酶，由SKP1蛋白、Cullin1蛋白、RBX1蛋白和可变的F-box蛋白组成，广泛存在于真核生物中，在生长发育和胁迫应答中发挥重要作用。

建立体外泛素化修饰检测系统，对于探索E3泛素连接酶和底物蛋白的特异识别关系及其在生长发育中的分子机理颇为重要。然而，由于多亚基SCF E3泛素连接酶的组成比较复杂，获得具有活性的E3复合体组分并鉴定与其特异协同工作的E2存在较大困难，植物来源的多亚基SCF E3泛素连接酶的体外活性重组体系尚未建立。

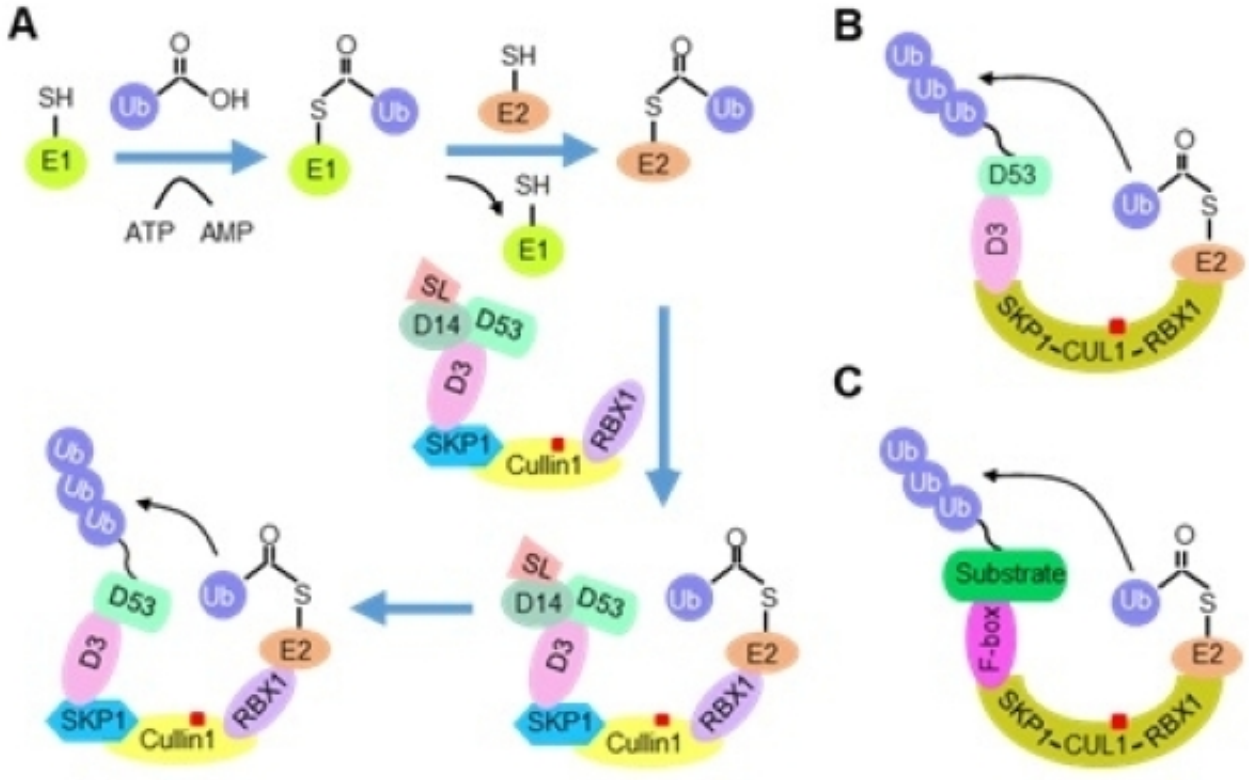
中国科学院遗传与发育生物学研究所李家洋研究组长期从事植物激素独脚金内酯相关分子机理研究。前期研究发现，在独脚金内酯信号通路中，独脚金内酯促进其受体蛋白D14与F-box蛋白D3以及底物蛋白D53互作，SCF^{D3} E3连接酶进而对D53蛋白进行泛素化修饰和降解，解除D53蛋白对下游基因转录的抑制作用（Jiang et al., *Nature*, 2013；Wang et al., *Nature*, 2020）。其中，D53蛋白的泛素化是独脚金内酯信号转导的关键事件。

6月24日，李家洋研究组在*Molecular Plant*上，在线发表了题为An engineered platform for reconstituting functional multisubunit SCF E3 ligase in vitro的研究论文。该研究以水稻的SCF^{D3} E3连接酶为出发点，通过质谱鉴定了SCF^{D3} E3复合体组分并在原核、真核系统中进行了表达纯化，进一步筛选了能与SCF^{D3} E3连接酶协同工作的E2，并在体外重组了有活性的SCF^{D3} E3连接酶。为提高重组效率，研究团队设计了串联融合蛋白SKP1-Cullin1-RBX1（eSCR），并利用eSCR融合蛋白在体外重组了有活性的eSCF^{D3} E3连接酶。SCF^{D3} E3和eSCF^{D3} E3连接酶均能在体外催化底物蛋白D53的泛素化修饰，加入受体蛋白D14和独脚金内酯人工合成类似物*rac*-GR24能够进一步增强D53蛋白的泛素化水平，与内源独脚金内酯信号传导相一致，说明利用该体外系统能够反映内源独脚金内酯信号转导的状态，为剖析不同植物中独脚金内酯信号转导途径提供了新的技术体系。

该研究进一步以eSCR为骨架蛋白，与水稻赤霉素信号途径的F-box蛋白GID2重组，获得了有活性的eSCF^{GID2} E3泛素连接酶；与调控人类肿瘤发生的关键F-box蛋

^{CDC4} E3和eSCF^{Fbx118} E3泛素连接酶，其中eSCF^{CDC4}
E3能够在体外对其底物蛋白HsSic1进行泛素化修饰。该技术在真核生物多亚基SCF
E3泛素连接酶研究中颇具应用前景。上述成果为解析多亚基SCF E3泛素连接酶与其底物蛋白的特异性识别关系提供了可靠的系统，并为探究激素信号转导机制、鉴定癌症治疗靶标及其他生物学过程提供了重要平台。

研究工作得到国家自然科学基金和中科院青年创新促进会的支持。



多亚基SCF E3泛素连接酶体外活性重组方法技术平台展示。A、利用表达纯化的SKP1、Cullin1、RBX1、D3、OsUb、OsE1和OsE2（OsUBC14），在体外重组有活性的SCF^{D3}
E3泛素连接酶；B、利用SKP1-Cullin1-RBX1（eSCR）融合蛋白，在体外重组有活性的eSCF^{D3}
E3泛素连接酶；C、eSCR融合蛋白能够与不同的F-box重组出多种eSCF
E3，在体外实现底物蛋白的泛素化修饰。红色方块代表NEDD8修饰。

研究团队单位：遗传与发育生物学研究所

更多 科学进展 请访问 https://www.iikx.com/news/progress/

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，爱科学iikx.com转发