



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20180153

Degron——细胞蛋白的快速降解及可逆调控技术

马文建¹, 陈洪冉¹, 刘菲¹, 邢思捷¹, 刘兰梅²

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 山东益都中心医院, 青州 262522)

摘要: 蛋白质的正常表达及降解对维持细胞功能平衡至关重要, 当蛋白质功能异常或生物合成等发生错误时, 会被识别、标记并被迅速降解, 从而保证细胞生存环境的稳定. 细胞内的蛋白降解, 依赖于蛋白酶体系统对特定氨基酸序列或构象变化的识别. 利用这一特性, 近年来建立了一种快速并可逆诱导体内蛋白降解的技术——蛋白降解子 (Degron). 通过与目的基因进行融合, Degron 可以靶向调控几乎任何蛋白的表达, 成为研究蛋白功能及信号传导等细胞分子机制的利器. 本文综述了这一技术的原理和发展概况, 并介绍了几种成熟的 Degron 系统.

关键词: 蛋白降解子; 泛素; 蛋白酶体; 蛋白调控

中图分类号: Q31 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(0000)00-0000-00

Degron—A Technique for Rapid and Reversible Regulation of Cellular Proteins

MA Wenjian¹, CHEN Hongran¹, LIU Fei¹, XING Sijie¹, LIU Lanmei²

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Shandong Yidu Central Hospital, Qingzhou 262522, China)

Abstract: Precise control of protein expression and its degradation are critical in maintaining cell functions. Proteins are identified and marked for degradation once their functions are inconsistent or errors occurred during synthesis, which ensures a stable environment for cell survival. Protein degradation in cells relies on the identification of specific amino acid sequences or conformational changes by the protease system. Based on this property, a technique called 'Degron' that can induce protein degradation rapidly and reversibly in vivo has been developed in recent years. Degron can be used to target and regulate almost all kinds of proteins, so it serves as a powerful tool for studying the function of proteins and the mechanism of cellular signals. This paper summarizes the principles and progress in this field, and introduces several successful Degron systems as well.

Keywords: Degron; ubiquitin; protease; protein regulation

在哺乳动物以及自然界的大部分物种中, 遗传及生理功能信息的传递遵循分子生物学的中心法则: 从 DNA 经由 RNA 向蛋白质传递. 作为最终的表达产物和功能分子, 蛋白质的产生和降解对细胞平衡至关重要. 在生物工程以及人类健康产业等领域, 调控蛋白质表达被广泛应用于生物活性物质的工业生产、疾病机制研究以及药物开发.

通常对蛋白的调控多是间接的, 一种方式是通过

敲除或改变其编码的基因序列, 使蛋白质无法表达或发生功能突变^[1-2], 这种方式随着近年来 CRISPR/Cas9 技术的出现而变得越来越容易, 特别是对于之前难以完成的哺乳动物体细胞蛋白调控, 因而应用也随之更普遍^[2-3]. 另一种方式是通过 RNA 干扰 (RNAi) 调低 mRNA 水平, 从而降低蛋白质的表达, 这是 CRISPR 出现前最为普遍应用的技术^[4]. 然而, 上述所有系统因其间接性, 使得对蛋白调节需要的时

收稿日期: 2018-05-22; 修回日期: 2018-08-27

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (2017YFD0400304); 天津市高等学校创新团队培养计划资助项目 (TD13-5015)

作者简介: 马文建 (1970—), 男, 山东人, 教授; 通信作者: 刘兰梅, 主治医师, mary_72@sina.com

间较长. 此外, 通过基因缺失或改变以调控蛋白表达是一个不可逆的过程, 会诱发细胞功能的适应性调节, 例如激活替补信号通路等, 从而增加蛋白功能研究的难度. 对于 RNA 干扰 (RNAi) 系统, 还可能会产生非靶标效应和沉默的泄漏.

因此, 发现和建立能够可逆调控蛋白表达的新技术手段, 对于研究蛋白功能和信号通路具有巨大意义. 目前已开发出的调节蛋白定位或功能的系统, 在基础研究领域有广泛的应用^[2]. 例如通过将靶蛋白与类固醇激素或四环素基因融合的 Tet-ON/OFF 系统, 可在启动子上加一个开关, 从而条件性的控制基因表达^[5]. 但是, 基因编辑、RNA 干扰、启动子通常仅适用于某些类型的蛋白质, 例如涉及大分子相互作用的蛋白质或位于细胞核中的蛋白质, 具有一定的局限性. 此外, 细胞中有大量功能无可替代的必需蛋白, 其缺失会导致细胞的死亡. 研究这类蛋白的功能, 通常无法通过从 DNA 或 RNA 水平上调控其基因表达来实现.

近年来, 一种称为蛋白降解子 (Degron) 的革命性蛋白调控技术, 使必需蛋白的功能研究成为可能. Degron 蛋白降解子技术直接调控靶标蛋白, 相对于 DNA 调控或转录水平调控更为快速、精准并且可逆. 这一技术主要通过调节泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 中的泛素连接酶如 SCF (Skp1, Cullin 和 F-box) 复合物来发挥作用. Degron 蛋白降解子技术应用广泛, 意义重大, 因此本文综述了这一技术的发展、原理及应用.

1 蛋白降解子——Degron

真核细胞中的蛋白水解主要由泛素-蛋白酶体系统 (UPS) 和自噬-溶酶体系统介导^[6]. 蛋白降解子是蛋白上包含的一段特定氨基酸序列, 可被细胞内的蛋白酶识别, 以介导蛋白的降解清除^[7]. 大多数蛋白降解子存在于编码靶蛋白的 DNA 序列中, 少数是在翻译过程中或翻译后添加到靶蛋白上. 蛋白降解子通常位于蛋白的 N 末端或 C 末端, 因而容易被蛋白酶或者其他连接蛋白识别并结合^[8]. 相对于蛋白 C 端的降解信号, 蛋白 N 端附近的序列与降解的相关性更为密切, 有时 N 端一个氨基酸的改变甚至可以使蛋白质对蛋白酶变得敏感, 称为 N 端法则^[9]. N 端法则主要存在于 UPS 降解途径中, 通过 N 末端特定氨基酸残基以及翻译后修饰 (post-translational modification, PTM) 共同影响蛋白质的体内半衰期^[10].

2 泛素-蛋白酶体系统

泛素-蛋白酶体系统 (UPS) 分为泛素依赖性和非依赖性两种蛋白酶体降解系统^[11]. 泛素是一种存在于所有真核生物中的小分子蛋白, 由 76 个氨基酸组成, 其主要功能为标记需要降解的蛋白质, 进而利用 26S 蛋白酶体对靶蛋白进行降解^[6]. 泛素是通过一系列泛素启动酶的作用而与靶蛋白连接的, 其中泛素启动酶包括 E1 泛素激活酶、E2 泛素结合酶和 E3 泛素连接酶^[12]. 其降解过程首先是在三磷酸腺苷 (ATP) 参与下, 游离的泛素被泛素激活酶 E1 激活, E1 上的半胱氨酸残基与泛素 C 末端的甘氨酸残基之间形成硫酯键^[13]. 活化的泛素被转移到 E2 的活性半胱氨酸残基上, 形成高能硫酯键. 随后 E2 再将泛素传递给相应的 E3, 后者可直接或间接促进泛素转移到靶蛋白上, 与靶蛋白的赖氨酸氨基通过异肽键连接. 通常, 靶蛋白可连接多个泛素形成多聚泛素链, 称为泛素化过程 (图 1)^[14]. 蛋白被泛素标记后, 可被蛋白酶体识别, 作为其底物而被降解. 泛素化主要存在于真核生物中, 在细菌体内没有泛素的存在, 只有少数已知的标记蛋白质降解^[6].

3 蛋白降解子调控系统

蛋白降解子 (Degron) 是蛋白质的一部分, Degrons 存在于各种生物体中, 从酵母中首次发现的 N-degrons 到小鼠鸟氨酸脱羧酶的 PEST (脯氨酸 (P)、谷氨酸 (E)、丝氨酸 (S) 和苏氨酸 (T)) 序列^[15-16]. 已经在原核生物^[17]以及真核生物中鉴定出 Degrons. 虽然有许多类型的不同的 Degrons, 并且即使在这些种类中也存在高度的变异性, 但是它们在调节蛋白质降解速率方面都是相似的.

迄今为止, 基于蛋白降解子原理开发的蛋白降解系统已有多种. 依据其诱导方式, 大致可分为小分子诱导、温度诱导、光诱导这 3 类蛋白降解子系统. 小分子诱导是指利用一些生物激素类或化学小分子物质来控制蛋白降解子的活化, 目前已被应用的蛋白降解子系统有植物激素诱导蛋白降解子 (auxin-inducible degron, AID)、不稳定域 (destabilization domain, DD)、配体诱导的降解 (ligand-induced degradation, LID)、烟草病毒蛋白酶诱导的蛋白质失活 (tobacco etch virus protease-induced protein inactivation, TIPI)、荧光蛋白的降解 (degrade green fluo-

rescent protein, deGradFP)、小分子辅助开关 (small molecule-assisted shutoff, SMASh)、泛素破坏降解 (split ubiquitin for the rescue of function, SURF) 等. 温度诱导系统 (ts-Degron 或 TSD) 目前主要是通过从小鼠中克隆的二氢叶酸还原酶 (DHFR) 的一种突变体来实现, 利用其对温度的敏感性来激活蛋白降

解子. 光诱导系统 (PSD 或 B-LID) 包括从拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中克隆的光-氧-电压 (LOV) 调控系统, 以及来源于小鼠的鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 系统. 本文将通过下面几种模型来介绍可控型蛋白降解子的工作原理及应用 (表 1).

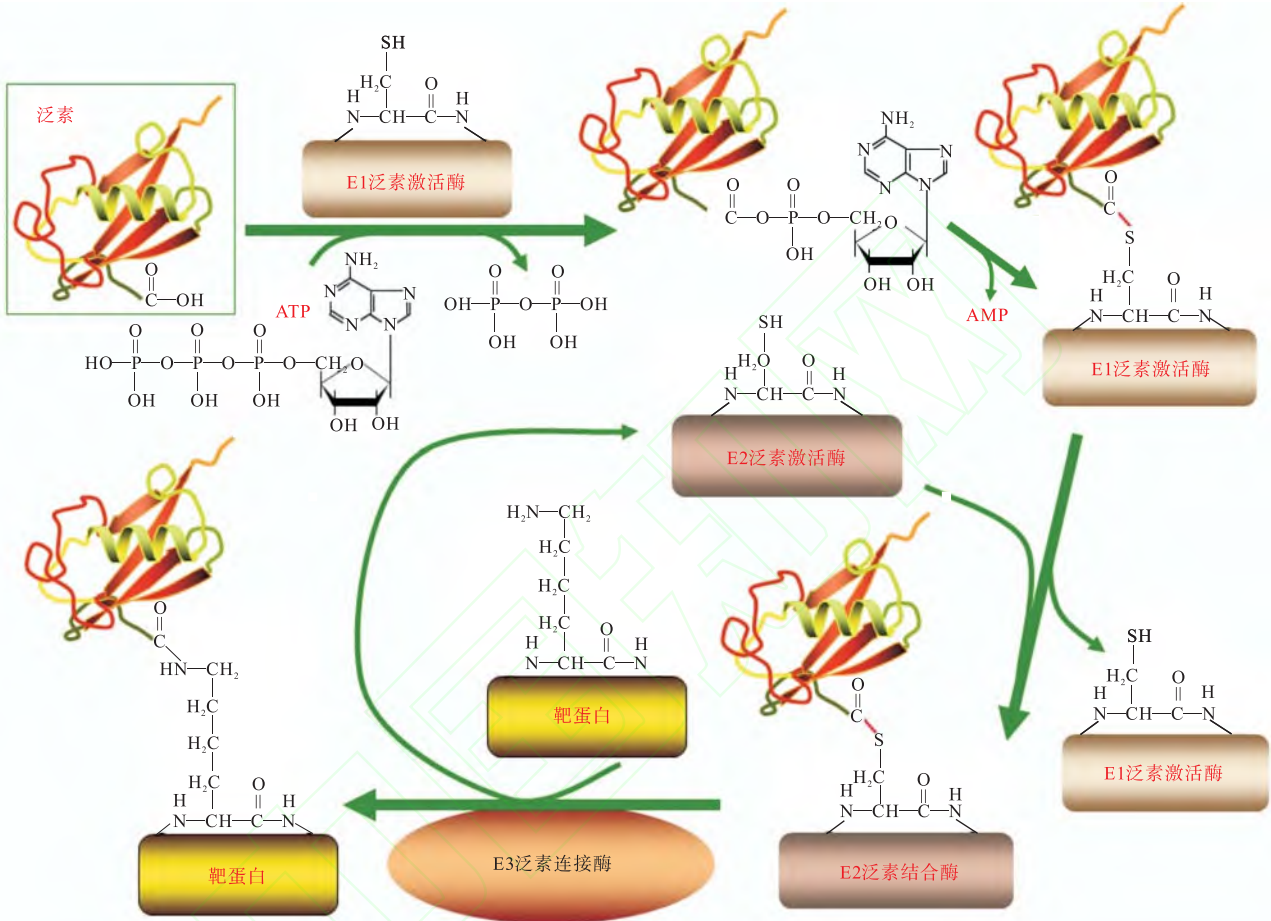


图 1 泛素化基本过程

Fig. 1 Basic process of ubiquitination

表 1 蛋白降解子技术的比较

Tab. 1 Comparison of conditional Degron-based technology

蛋白降解子系统	AID	SMASh	TSD	PSD 或 B-LID
是否在酵母中工作?	是	是	是	是 (PSD)
是否在哺乳细胞中工作?	是	是	有限制	是 (B-LID)
蛋白降解子蛋白相对分子质量	2.5×10^4	3.4×10^4	2.5×10^4	2.0×10^4
半衰期	30 min 内	目的蛋白半衰期	30 min 内	约 30 min
诱导条件	IAA/NAA	HCV 蛋白抑制剂	温度	蓝光
所需修饰蛋白数量	2	1	1	1
参考文献	[2]	[18]	[19]	[2]

3.1 小分子诱导的蛋白降解子系统

3.1.1 正向激活的蛋白降解子

小分子诱导系统的一个典型代表是植物激素诱导的蛋白降解子系统 AID. 其依赖的是在植物中发

现的一类独特的植物生长激素 (auxin), 这种激素可诱导细胞降解对 AUX/IAA 蛋白家族起抑制作用的转录抑制因子, 从而激活 AUX/IAA 家族蛋白的基因表达, 促进植物生长发育. 其分子机制是生长激素作

用于一种称为 SCF 复合体的 E3 泛素连接酶, SCF 复合体含有 3 个关键亚基(Skp1 桥接蛋白亚基、Cullin 骨架蛋白亚基以及 F-box 蛋白)和一些辅助组分(例如协助识别赖氨酸残基的 RBX1 蛋白因子)^[11]. 植物生长激素首先结合到其中称为 TIR1 的一类 F-box 蛋白, 使后者的构象发生改变, 从而结合要降解的目标蛋白. 目标蛋白结合到 SCF 复合体上后, SCF-TIR1 募集 E2 泛素结合酶, 通过泛素化蛋白降解途径降解目标蛋白(图 2)^[20].

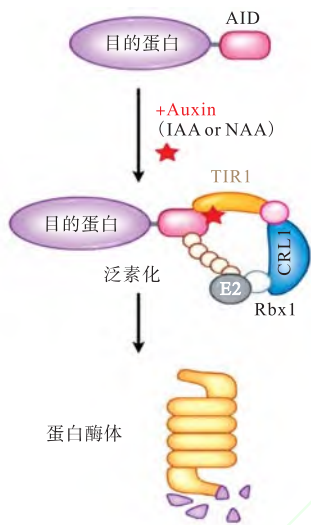


图 2 植物激素生长素系统

Fig. 2 Schema of auxin-inducible Degron technology

SCF 复合体在真核生物中高度保守, 其他真核生物虽然不具备对植物生长激素的直接应答, 但存在 SCF 介导的蛋白降解途径. 因而, 将编码 AID 蛋白降解子系统的基因转入非植物细胞, 就可以用植物生长激素这种小分子物质调控蛋白质的表达和降解^[21]. AID 系统对生长激素响应迅速, 对靶蛋白的降解是可逆的, 可应用于广泛物种的细胞系, 提供一个强大的调控蛋白质表达和研究蛋白质功能的工具.

系统的构建首先是在编码要调控的目的蛋白质的基因位点, 通过基因改造融合一个 AID 蛋白降解子的序列. 这个序列(AID 标签)原则上可以放在此靶基因的氨基(N-)或羧基(C-)末端, 但 N 端规则使系统在 N 端可以更灵活的工作^[18-9, 22-23]. 之后, 即可通过植物生长激素调控目标蛋白的降解. 天然生长素 3-吲哚乙酸(IAA)和人工合成的生长素 1-萘乙酸(NAA)均可诱导 AID^[24]. 这一蛋白降解子系统作用迅速, 在加入 IAA 或 NAA 后 30~60 min 内融合蛋白质即可被迅速降解^[2]. 此外, 因为动物或酵母等真核细胞中不存在对植物生长素反应的其他受体, 植

物生长激素及 F-box 蛋白质不会引起除 AID 外的其他生理变化, 因而基本不会有脱靶现象.

3.1.2 反向调控的蛋白降解子

2015 年斯坦福大学 Chung 等^[18]开发了一种称为 SMASH 的新型蛋白降解子. SMASH 意为“小分子辅助开关”, 它通过化学降解的方式来调控蛋白. 其原理是: 所要调控的目标蛋白与一个蛋白降解子(Degron)通过一个蛋白水解酶(protease)相连, 如图 3 所示. 通常, 这一融合蛋白被转录表达后, 其中的蛋白水解酶会立即切除蛋白降解子部分, 因而目标蛋白不受所连的蛋白降解子的影响, 可稳定存在. 这一系统中使用的蛋白水解酶是丙肝病毒(HCV)蛋白水解酶 NS3, 针对此酶临床上已有安全有效的抑制剂. 在含有“目标蛋白-NS3-Degron”基因序列的细胞中, 加入 NS3 的抑制剂会阻断所表达的融合蛋白中 Degron 部分被移除, 从而整个融合蛋白因带有 Degron 标签而被快速降解.

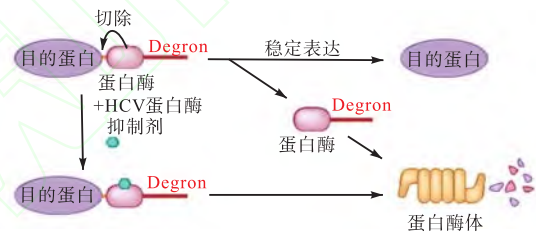


图 3 小分子辅助开关(SMASH)系统

Fig. 3 Schema of small molecule-associated shutoff technology

已证明, 在酵母和多种类型的哺乳动物细胞中, SMASH 可令各种蛋白质降解, 这种降解具有药物剂量依赖性并且可逆^[18]. 特别值得一提的是, 利用 SMASH 技术实现了对一种具有临床价值的 RNA 病毒所表达蛋白的调控. 这一蛋白发挥重要的治疗作用, 但在其发挥效用后必须被降解, 以免引起其他副作用. 而对此蛋白有效的抑制剂目前尚不存在^[18].

相比于 AID 及其他蛋白调控方法, SMASH 的优势在于: 首先, 它不需要同很大的蛋白结构域进行融合, 仅涉及单一的遗传修饰, 甚至只需要一个基因编码的修饰或改变, 从而最小化了对目标蛋白的修改; 其次, 不依赖于蛋白与蛋白相互作用, 使用的是无毒的临床药物, 因而可很容易推广到多种生物环境中, 在哺乳动物细胞和酵母中均已证明可有效作用; 此外, 在医学应用方面, SMASH 可以起到类似于特异性蛋白抑制剂的作用, 具有广义抑制作用且易于实施. 因而, SMASH 技术可潜在应用于解决医学和生

物技术中的多种问题,从研究基因功能到构建多种功能的工程细胞等。

3.2 温度诱导的蛋白降解子系统

当蛋白质在 N 端暴露的氨基酸残基为非甲硫氨酸(Met)残基,如精氨酸(Arg)、赖氨酸(Lys)、酪氨酸(Tyr)或苯丙氨酸(Phe)时,称为不稳定 N 末端,可被泛素-蛋白酶体途径识别并被有效降解^[21]。这类位于 N 端的不稳定残基由 Ubr1(酵母(*Saccharomyce*)中)和 PRT1(拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中)等 E3 泛素连接酶识别或快速多泛素化,随后被 26S 蛋白酶体降解^[25-26]。利用这一特性,Suzuki 等^[27]在酵母中构建了最初的组成型 N-Degrans。为了产生可调控的 N-Degron,他们开发温度敏感的 Degron(ts-Degron 或 TSD)系统,其原理是将编码二氢叶酸还原酶(DHFR)的一种温度敏感型突变体的基因(ts-DHFR)连接到感兴趣的目标基因,使之编码一个融合蛋白。ts-DHFR 蛋白的 N 端暴露为精氨酸残基(R-DHFRts),其在 23 °C 是稳定的,可长时间存在,但在 37 °C 时会被迅速降解^[19, 28]。因而,通过改变酵母培养的温度,含有 ts-DHFR 和靶向目的蛋白的融合蛋白,可被快速的降解^[19, 28]。该系统不仅反应快速而且可逆,仅需改变温度条件,因而可方便用作调控细胞内蛋白质水平的快速开关系统。

作为目标调控蛋白的 N 末端标签,温控蛋白降解子大小为 2.6×10^4 ,由 3 个关键部分组成:(1)泛素分子。位于 N 端的最末端,目的是增加融合蛋白表达的效率,翻译后会被去泛素化酶从融合蛋白上移除^[29]。(2)对温度变化敏感的二氢叶酸还原酶突变体(DHFRts)。其功能是在高温时,激活融合蛋白的降解。(3)可导致蛋白不稳定的 N 末端残基。位于 Ub 和 DHFRts 连接处,翻译后在蛋白去泛素化过程中会暴露出来,是一种休眠 N-Degron,可以被 E3 Ub 连接酶识别(图 4)。

编码上述 Degron 的基因插入到要调控的目的基因的 5'末端,转录翻译后产生融合蛋白 Ub-R-DHFRts-POI 的表达。利用泛素-蛋白酶体系统去特异性降解目的蛋白是通过一种二氢叶酸还原酶突变体以及泛素分子结合,实现蛋白降解子的初步效果^[28]。之后,泛素被泛素蛋白特异性蛋白酶切割,导致 R-DHFRts-POI 中 N 端不稳定的 R 残基(例如 Arg)暴露,从而被 Ubr1 E3 泛素连接酶识别并降解整个融合蛋白。去泛素化反应后,融合蛋白在允许的温度范围(23 ~ 25 °C)内仍能稳定存在(因蛋白折叠,N 末端残基未暴露出来)。而在更高温度(大约 37 °C)条

件下,R-DHFRts 的展开被泛素酶系统识别,从而导致 R-DHFRts-POI 快速多聚泛素化以及被 26S 蛋白酶体的蛋白水解(蛋白半衰期 < 30 min)。上述反应是由 N 端 Arg 残基的暴露增加,R-DHFRts 的内部 Lys 残基的暴露,或二者共同引起的^[2]。

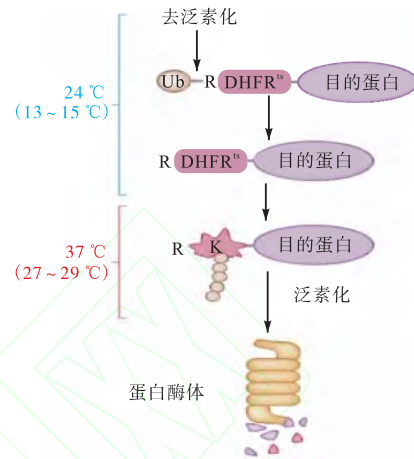


图 4 温度诱导系统

Fig. 4 Schema of temperature-induced conditional Degron technology

3.3 光诱导的蛋白降解子系统

光诱导的蛋白降解子系统,其基本原理一般是通过光来诱导特定光敏蛋白构象变化或去离子化,并进而影响与其相连的 Degron 结构变化,由非活性构象转化为活性构象,进而导致融合蛋白被蛋白酶体降解。

例如由拟南芥中克隆的光-氧-电压(LOV2)光敏蛋白基因,可被用作光感受器。LOV2 结构域结合由蓝光激发的辅助因子 flavin-mononucleotide(FMN)。随后,LOV2 的半胱氨酸残基的侧链与 FMN 的 C4a 原子形成共价键。这诱导了 LOV2 核心的结构变化,导致感光器羧基末端的 α -螺旋展开^[30-31]。与 LOV2 相连的 Degron 序列是源自鼠的鸟氨酸脱羧酶(ODC),是一段称为 cODC1 的变体^[32-33]。ODC 的降解序列位于酶的羧基末端,泛素对于 ODC 的降解并非必需,这一点不同于绝大多数泛素依赖性的蛋白酶体底物^[11]。活化 ODC 决定子需满足:在 C 末端 19 个氨基酸上游处是一个半胱氨酸-丙氨酸结构组成的,并且被其两侧没有二级结构的总长为 37 个氨基酸的多肽所环绕^[34-35]。

组成的降解子系统在蓝光激发下,光受体构象变化,为了产生光激活的决定子,将拟南芥 LOV2 结构域与通过 26S 蛋白酶体诱导泛素非依赖性降解^[36]。在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中发现 LOV2-ODC 蛋白在黑暗中稳定,但在蓝光照射时变得不稳

定,名为光敏蛋白降解子(PSD)^[33, 37]. 光敏蛋白降解子有多种变体, Renicke 等^[32]开发了另一种称为蓝光诱导性决定子(B-LID)的 Degron, 蓝光照射下,可在酿酒酵母中诱导蛋白降解. 在此基础上, Bonger 等^[38]研究了 B-LID 的突变,使其可在哺乳动物细胞和斑马鱼中诱导蛋白水解. 上述两种 Degron 中的 LOV2 在黑暗状态下,与之相连的 Degron 无活性. 蓝光照射下,可诱导 LOV2 的构象变化,暴露出去离子部分,进而接触和激活与之相连的 Degron^[30],如图 5 所示. 随后,蛋白质被蛋白酶体降解. 目的蛋白降解很快,通常半衰期仅需 30 min^[2]. 目前,光诱导蛋白降解子已被用于线虫等生物体^[39]. 基于光遗传学在神经科学研究中的重要性,光控制的 Degrons 可能在这个领域有巨大应用前景.

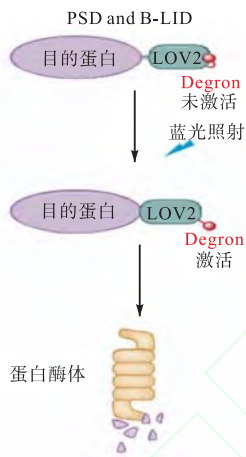


图 5 光诱导系统

Fig. 5 Schema of light-induced Degron technology

4 蛋白降解子的生理功能及应用

4.1 蛋白降解子在癌症等疾病中的作用

癌症的产生是大量基因突变积累的产物,例如超过一半的癌症中含有 P53 基因的突变^[40]. 同时,癌症中基因也常常表达异常,出现基因重复,染色体非整倍性或重构,导致原癌基因表达上升以及抑癌基因下降^[41-44]. 鉴于大多数降解子是嵌入在模块蛋白质序列内的短序列,属于蛋白质丰度的调节位点,因而对于许多细胞过程的调控(例如调节细胞周期和监测细胞代谢)极为重要. 此外,降解子能消除不再需要的蛋白质,防止其可能导致的细胞功能障碍. 人类基因组编码约 600 个 E3 泛素连接酶,但目前对这些酶所调节的蛋白降解子还所知甚少. 鉴于癌基因的表达增强和肿瘤抑制因子丰度的减少均与蛋白质降解机

制相关,因此了解蛋白质降解机制对于许多疾病尤其是癌症显得至关重要.

例如,在许多癌症中, β -连环蛋白的降解出现障碍,被认为是驱动致癌作用的最严重突变之一^[45]. β -连环蛋白是 Wnt 信号通路的关键下游组件,其降解是通过一个由 AXIN、GSK-3 β 、CK1 以及 PP2A 等多个亚基组成的复合物来完成^[46]. 首先 β -连环蛋白经由磷酸化等多步复杂修饰过程后,被 SCF $^{\beta}$ -TrCP 识别并结合 E3 连接酶,最终被蛋白酶体降解^[47]. 将 β -连环蛋白上的蛋白降解子序列突变,则可用于调节 Wnt 信号通路,研究癌症等疾病的发生机制^[48-49]. 目前除了 β -连环蛋白外,关于 Degron 功能对于癌症发生等方面的影响揭示的不多.

4.2 利用 Degron 优化 CRISPR 基因编辑系统

蛋白降解子不仅对癌症等疾病治疗有潜在的重要应用,还可作为其他分子技术的辅助工具. 例如目前火热的基因编辑技术 CRISPR-Cas9,虽然可方便进行基因改造,但其脱靶现象一直难以解决. 多层面(包括剂量、时间、特异性以及同步独立调控多个基因等)控制此技术的方法仍然缺乏. 最近,麻省理工哈佛博得研究所的 Maji 等^[50]利用小分子调节的蛋白降解子(Degron),实现了对不同的 Cas9 系统进行多维调控. 通过小分子不稳定区域融合赋予 Cas9 “化学”控制,包括剂量、时间、基因目标和特异性,实现了对全基因组的探索,极大地改善了其工作效率.

5 结 语

总之,蛋白降解是细胞内蛋白调控的核心功能之一. 近年来发展起来的蛋白降解子技术,在蛋白调控、细胞信号传导机制研究以及基因治疗药物开发等领域具有巨大的潜在应用价值. 需要指出的是,人类蛋白质组中已知约存在 600 个 E3 连接酶,目前仅定义了大约 25 种类型的蛋白降解子基因序列^[46]. 对蛋白降解子的深入研究,不仅将促进基础生物学机制的研究,在药物开发等领域也有广阔的应用前景.

参考文献:

- [1] Capecchi M R. Altering the genome by homologous recombination[J]. Science, 1989, 244 (4910): 1288-1292.
- [2] Natsume T, Kanemaki M T. Conditional Degrons for controlling protein expression at the protein level[J]. Annual Review of Genetics, 2017, 51: 83-102.

- [3] Doudna J A, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9[J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096.
- [4] Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. *Nature*, 2001, 411(6836): 494–498.
- [5] Müller K, Zurbriggen M D, Weber W. An optogenetic upgrade for the Tet-OFF system[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(7): 1483–1487.
- [6] Ji C H, Kwon Y T. Crosstalk and interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy[J]. *Molecules and Cells*, 2017, 40(7): 441–449.
- [7] Melvin A T, Woss G S, Park J H, et al. Measuring activity in the ubiquitin-proteasome system: From large scale discoveries to single cells analysis[J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2013, 67(1): 75–89.
- [8] Hwang C S, Shemorry A, Varshavsky A. N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals[J]. *Science*, 2010, 327(5968): 973–977.
- [9] Eldeeb M, Fahlman R. The-N-end rule: The beginning determines the end[J]. *Protein and Peptide Letters*, 2016, 23(4): 343–348.
- [10] Dissmeyer N, Rivas S, Graciet E. Life and death of proteins after protease cleavage: Protein degradation by the N-end rule pathway[J]. *The New Phytologist*, 2018, 218(3): 929–935.
- [11] Eraldes J, Coffino P. Ubiquitin-independent proteasomal degradation[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2014, 1843(1): 216–221.
- [12] Zheng N, Shabek N. Ubiquitin ligases: Structure, function, and regulation[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2017, 86: 129–157.
- [13] Ortega Z, Lucas J J. Ubiquitin-proteasome system involvement in Huntington's disease[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2014, 7: 77.
- [14] Kearsey S E, Gregan J. Using the DHFR heat-inducible degron for protein inactivation in *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2009, 521: 483–492.
- [15] Bachmair A, Finley D, Varshavsky A. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue[J]. *Science*, 1986, 234(4773): 179–186.
- [16] Loetscher P, Pratt G, Rechsteiner M. The C terminus of mouse ornithine decarboxylase confers rapid degradation on dihydrofolate reductase. Support for the pest hypothesis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(17): 11213–11220.
- [17] Burns K E, Liu W-T, Boshoff H I M, et al. Proteasomal protein degradation in *Mycobacteria* is dependent upon a prokaryotic ubiquitin-like protein[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(5): 3069–3075.
- [18] Chung H K, Jacobs C L, Huo Y, et al. Tunable and reversible drug control of protein production via a self-excising degron[J]. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(9): 713–720.
- [19] Dohmen R J, Varshavsky A. Heat-inducible degron and the making of conditional mutants[J]. *Methods in Enzymology*, 2005, 399: 799–822.
- [20] Tan X, Calderon-Villalobos L I A, Sharon M, et al. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase[J]. *Nature*, 2007, 446(7136): 640–645.
- [21] Nishimura K, Fukagawa T, Takisawa H, et al. An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(12): 917–922.
- [22] Lee K E, Heo J E, Kim J M, et al. N-Terminal acetylation-targeted N-end rule proteolytic system: The Ac/N-end rule pathway[J]. *Molecules and Cells*, 2016, 39(3): 169–178.
- [23] Hwang C S, Shemorry A, Auerbach D, et al. The N-end rule pathway is mediated by a complex of the RING-type Ubr1 and HECT-type Ufd4 ubiquitin ligases[J]. *Nature Cell Biology*, 2010, 12(12): 1177–1185.
- [24] Chapman E J, Estelle M. Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants[J]. *Annual Review of Genetics*, 2009, 43(1): 265–285.
- [25] Bartel B, Wüning I, Varshavsky A. The recognition component of the N-end rule pathway[J]. *EMBO Journal*, 1990, 9(10): 3179–3189.
- [26] Potuschak T, Stary S, Schlögelhofer P, et al. PRT1 of *Arabidopsis thaliana* encodes a component of the plant N-end rule pathway[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(14): 7904–7908.
- [27] Suzuki T, Varshavsky A. Degradation signals in the lysine-asparagine sequence space[J]. *EMBO Journal*, 1999, 18(21): 6017–6026.
- [28] Dohmen R J, Wu P, Varshavsky A. Heat-inducible degron: A method for constructing temperature-sensitive

- mutants[J]. *Science*, 1994, 263 (5151) : 1273–1276.
- [29] Baker R T, Smith S A, Marano R, et al. Protein expression using cotranslational fusion and cleavage of ubiquitin. Mutagenesis of the glutathione-binding site of human Pi class glutathione S-transferase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269 (41) : 25381–25386.
- [30] Harper S M, Neil L C, Gardner K H. Structural basis of a phototropin light switch[J]. *Science*, 2003, 301 (5639) : 1541–1544.
- [31] Christie J M, Salomon M, Nozue K, et al. LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1) : Binding sites for the chromophore flavin mononucleotide[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96 (15) : 8779–8783.
- [32] Renicke C, Schuster D, Usherenko S, et al. A LOV2 domain-based optogenetic tool to control protein degradation and cellular function[J]. *Chemistry & Biology*, 2013, 20 (4) : 619–626.
- [33] Jungbluth M, Renicke C, Taxis C. Targeted protein depletion in *Saccharomyces cerevisiae* by activation of a bidirectional degron[J]. *BMC Systems Biology*, 2010, 4 : 176.
- [34] Takeuchi J, Chen H, Coffino P. Proteasome substrate degradation requires association plus extended peptide[J]. *EMBO Journal*, 2007, 26 (1) : 123–131.
- [35] Takeuchi J, Chen H, Hoyt M A, et al. Structural elements of the ubiquitin-independent proteasome degron of ornithine decarboxylase[J]. *The Biochemical Journal*, 2008, 410 (2) : 401–407.
- [36] Jariel-Encontre I, Bossis G, Piechaczyk M. Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2008, 1786 (2) : 153–177.
- [37] Usherenko S, Stübbe H, Muscò M, et al. Photo-sensitive degron variants for tuning protein stability by light[J]. *BMC Systems Biology*, 2014, 8 : 128.
- [38] Bongor K M, Rakhit R, Payumo A Y, et al. General method for regulating protein stability with light[J]. *ACS Chemical Biology*, 2014, 9 (1) : 111–115.
- [39] Hermann A, Liewald J F, Gottschalk A. A photosensitive degron enables acute light-induced protein degradation in the nervous system[J]. *Current Biology*, 2015, 25 (17) : R749–R750.
- [40] Goh A M, Coffill C R, Lane D P. The role of mutant p53 in human cancer[J]. *The Journal of Pathology*, 2011, 223 (2) : 116–126.
- [41] Laurie N A, Donovan S L, Shih C S, et al. Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma[J]. *Nature*, 2006, 444 (7115) : 61–66.
- [42] Gordon D J, Resio B, Pellman D. Causes and consequences of aneuploidy in cancer[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13 (3) : 189–203.
- [43] Veitia R A, Potier M C. Gene dosage imbalances : Action, reaction, and models[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2015, 40 (6) : 309–317.
- [44] Wilson B G, Roberts C W M. SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2011, 11 (7) : 481–492.
- [45] Mészáros B, Kumar M, Gibson T J, et al. Degrons in cancer[J]. *Science Signaling*, 2017, 10 (470) : eaak9982.
- [46] Stamos J L, Weis W I. The β -catenin destruction complex[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013, 5 (1) : a007898.
- [47] Wu G, Xu G, Schulman B A, et al. Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex : Destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP1) ubiquitin ligase[J]. *Molecular Cell*, 2003, 11 (6) : 1445–1456.
- [48] Provost E, McCabe A, Stern J, et al. Functional correlates of mutation of the Asp32 and Gly34 residues of beta-catenin[J]. *Oncogene*, 2005, 24 (16) : 2667–2676.
- [49] Uyar B, Weatheritt R J, Dinkel H, et al. Proteome-wide analysis of human disease mutations in short linear motifs: Neglected players in cancer?[J]. *Molecular Biosystems*, 2014, 10 (10) : 2626–2642.
- [50] Maji B, Moore C L, Zetsche B, et al. Multidimensional chemical control of CRISPR-Cas9[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13 (1) : 9–11.

责任编辑: 郎婧