

果蝇 F-box 基因 *Ppa* 促进脂肪储存

杨光武, 田媛

贵州大学生命科学学院, 贵阳 550025

摘要: 脂质是构成生物体的重要成分之一, 脂质代谢的精确调节和稳态维持对人类健康至关重要。泛素化途径通过降解脂质相关蛋白来调控脂质代谢。*Ppa* (*partner of paired*) 编码一种 F-box 蛋白, 后者是 SCF (Skp1-Cullin1-F-box) 泛素化复合体成员之一。已有的研究表明 *Ppa* 在调控果蝇体节的正常发育和着丝粒组蛋白的正确定位方面发挥重要的作用, 但在脂肪代谢方面的功能研究却未见报道。本研究以黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 作为研究对象, 探究了 *Ppa* 在脂肪储存中的功能。通过与绿色荧光蛋白融合表达, 检测 PPA 的亚细胞定位; 应用 CRISPR/Cas9 技术, 构建 *Ppa* 的缺失突变体; 通过 BODIPY 493/503 或 Nile red 脂滴染色, 对缺失突变体和超量表达 *Ppa* 果蝇的脂滴形态改变进行分析。随后, 在缺失突变体中超量表达 *Ppa* 以验证其功能。结果表明, PPA-GFP 融合蛋白定位于唾液腺和脂肪体的细胞核中。与对照组果蝇相比, *Ppa* 缺失突变体表现为脂滴变小; 超量表达 *Ppa* 显示出脂滴变大。在突变体中超量表达 *Ppa* 能够将脂滴回复至正常状态。综上所述, 本研究揭示了 *Ppa* 在果蝇中具有促进脂肪储存的功能。

关键词: 脂肪储存; 脂滴; CRISPR/Cas9; *Ppa*

The F-box gene *Ppa* promotes lipid storage in *Drosophila*

Guangwu Yang, Yuan Tian

College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: Lipid is one of the important components of living organisms. The precise regulation and homeostasis maintenance of lipid metabolism are essential to human health. The ubiquitination pathway regulates lipid metabolism by degrading lipid-related proteins. *Ppa* encodes an F-box protein, which is a member of the SCF ubiquitination complex. Previous studies reported that *Ppa* regulated the body segmentation and the correct localization of centromere histones, while its function in lipid metabolism has not been reported. In this study, *Drosophila melanogaster* was used to explore the function of *Ppa* in lipid storage. The subcellular localization of PPA was detected by fusion with green fluorescent protein. The deletion mutant of *Ppa* was constructed via CRISPR/Cas9 technology. The morphological changes of lipid droplets in deletion mutants and *Ppa* overexpression flies were analyzed by BODIPY 493/503 or Nile red staining. Further, *Ppa* was overexpressed in the deletion mutant to verify its function. The results showed that PPA-GFP fusion protein were localized

收稿日期: 2021-03-05; 修回日期: 2021-04-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31600962)和贵州省科学技术基金资助项目(编号: [2017]1043)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31600962) and Guizhou Provincial Science and Technology Foundation (No. [2017]1043)]

作者简介: 杨光武, 在读硕士研究生, 专业方向: 发育生物学。E-mail: ygw1996426@163.com

通讯作者: 田媛, 博士, 副教授, 研究方向: 果蝇脂肪代谢。E-mail: ytian1@gzu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.21-084

网络出版时间: 2021/5/7 14:44:00

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20210507.1031.002.html>

in the nuclei of salivary gland and fat body. Compared with the control flies, the lipid droplets in *Ppa* deletion mutants became smaller, and overexpression of *Ppa* exhibited larger lipid droplets. Overexpression of *Ppa* in the deletion mutant could restore the lipid droplets to normal state. In summary, this study demonstrated that *Ppa* could promote lipid storage in *Drosophila*.

Keywords: lipid storage; lipid droplets; CRISPR/Cas9; *Ppa*

脂质代谢紊乱与肥胖、高血压、糖尿病等代谢综合征息息相关^[1]。脂滴(lipid droplets, LDs)是由单层磷脂、中性核心脂质和相关蛋白组成的细胞器,大多数动物的中性脂质都储存在脂滴中^[2]。脂滴在许多方面都发挥着重要的生物学功能:首先,它是细胞内脂肪酸转运的重要位点,脂肪酸含量高的高脂细胞能够通过脂滴向相邻的低脂细胞转运脂肪酸^[3];其次,它是特定病毒的组装平台,肝细胞中的脂滴为极低密度脂蛋白的产生提供脂质基础,而丙肝病毒能够侵入极低密度脂蛋白分泌途径并附着在其表面,促进丙肝病毒以低密度脂病毒颗粒的形式释放^[4];在神经调节方面,遗传性痉挛性截瘫相关基因 *DDHD2* 的敲除小鼠表现出运动协调和认知能力的缺陷,并且在神经元中显示出大量的异位脂肪累积^[5]。脂滴的大小受到核心脂质含量、单层磷脂组成和促进脂滴融合相关蛋白的影响^[6,7]。大脂滴的形成有两种机制,一种是脂滴的生长和膨胀,通常是通过将中性脂质添加到脂滴核心来实现,另一种是由较小脂滴融合形成,但融合活性很低^[8]。

真核生物中广泛存在一类叫做 F-box 的蛋白家族^[9]。F-box 蛋白家族的 N 端具有特征性的 F-box 结构域,负责与其他蛋白结合形成 SCF 复合体,该复合体是一类 E3 泛素化连接酶,其 C 端具有底物识别结构域^[10]。F-box 蛋白与结合蛋白 Skp1、骨架蛋白 Cullin1 和 RING-finger 蛋白 Rbx1 共同组成 SCF 复合体。该复合体招募携带泛素分子的 E2 结合酶并识别底物蛋白,参与选择性降解生物活性蛋白质的泛素-蛋白酶体途径(ubiquitin proteasome pathway, UPP),在细胞凋亡、细胞周期调控、信号转导和免疫应激等方面发挥重要作用^[11,12]。研究表明,UPP 介导多个脂滴相关蛋白的降解,例如,PLIN1 是位于脂滴表面的特征性结合蛋白,能够抑制脂质降解,在小鼠的 3T3-L1 脂肪细胞中,PLIN1 与选择性自噬受体 SQSTM1 相互作用,并通过与泛素化蛋白特异

性结合来降解 PLIN1^[13,14]。

Ppa 是果蝇中继 *slmb* 后第二个被发现的编码 F-box 蛋白的基因^[15]。研究表明,*Ppa* 在早期胚胎发育过程中发挥作用。*Ppa* 在体内与由 *even skipped(eve)* 编码的 Eve 共同作用,抑制转录激活因子 Prd(由 *paired* 编码, *prd*),调控包括 *en (engrailed)* 在内的体节极性基因的表达。在 *eve* 正常表达的细胞中,*Ppa* mRNA 被 Eve 抑制,确保了 Prd 被激活,从而激活下游靶基因 *en* 的表达;而在 *eve* 不表达的细胞中,*Ppa* mRNA 紧挨 Prd,并将 Prd 条带降解,抑制下游靶基因 *en* 的表达^[16,17]。此外,*Ppa* 在着丝粒的稳定性维持方面也发挥重要作用,着丝粒组蛋白 CID 决定着丝粒的特性和功能,超量表达 *cid* 会使得该蛋白错误定位于染色体的非着丝粒区域,导致异位着丝粒的产生,从而引发染色体的错误分离^[18]。*Ppa* 介导的泛素化途径能够降解错误定位的 CID,使该蛋白重新定位于着丝粒^[19]。本研究通过蛋白定位、突变体分析和基因挽救实验,发现 *Ppa* 可以促进果蝇中的脂肪储存。

1 材料与方法

1.1 果蝇品系

实验中所用到的果蝇均在玉米面培养基中饲养,严格按照实验规章制度操作,果蝇来源及用途见表 1。

1.2 果蝇组织染色

将 3 龄幼虫在 1×PBS 缓冲液中解剖,获得脂肪体和唾液腺。将组织放入 4%多聚甲醛中固定 30 min 后,用 1×PBS 清洗 2 次,每次 5 min。使用脂滴染料 BODIPY 493/503 或者 Nile red 避光染色 30 min,使用细胞核染料 DAPI 避光染色 10 min,使用细胞

表 1 本研究中所用的果蝇品系

Table 1 The fly strains used in this study

基因型	来源	用途
<i>w¹¹¹⁸</i>	中国科学院遗传与发育生物学研究所黄勋研究员实验室	对照组
<i>w*</i> ; <i>ln(2LR)noc^{4L}Sco^{rv9R}, b¹/CyO, P {ActGFP}JMR1</i>	中国科学院遗传与发育生物学研究所黄勋研究员实验室	平衡致死系
<i>da-Gal4</i>	清华大学果蝇中心	全身表达的 Gal4
<i>y¹M{nos-Cas9.P}ZH-2A w*</i>	Bloomington	表达 Cas9 蛋白
<i>w;L/CyO</i>	本实验室	平衡致死系
<i>Ppa-sgRNA</i>	本实验构建	表达两段 sgRNA
<i>UAS-Ppa-RA/RC</i>	本实验构建	超量表达 PPA
<i>UAS-Ppa-RA/RC-eGFP</i>	本实验构建	PPA 的亚细胞定位

骨架染料 Phalloidin 594 避光染色 30 min。用 1×PBS 清洗 3 次,每次 5 min。在载玻片上滴加 30 μL 的 70% 甘油,将染色完毕的样品转移至载玻片上,盖玻片压片,最后用指甲油封片,将制作完成的片子在激光共聚焦显微镜上扫描成像。

1.3 PPA 的亚细胞定位分析

通过在 *Ppa-RA/RC* 编码区的 C 端添加表达绿色荧光蛋白的 GFP 序列,构建得到转基因果蝇 *UAS-Ppa-RA/RC-eGFP*。29℃下,利用 *da-Gal4* 驱动 *UAS-Ppa-RA/RC-eGFP* 的全身表达,解剖 3 龄幼虫的唾液腺和脂肪体,使用 DAPI 和 Phalloidin 594 染色标记细胞核和细胞骨架,激光共聚焦显微镜下扫描成像。

1.4 sgRNA 表达载体的构建

通过网站 www.flyrnai.org/crispr2 设计两段 sgRNA 序列,其位于 *Ppa* 的 CDS 区的第 78~97 nt 和第 518~538 nt,并在引物前添加 *BbsI* 酶切位点。将设计好的 sgRNA 序列在 Flybase 上进行序列比对,确保在基因组中没有其他配对区域。sgRNA 及检测引物序列见表 2。

根据设计的 sgRNA 序列合成单链寡核苷酸片段,经过退火形成两端有粘性突出末端的双链片段。用 T4 连接酶将 sgRNA1 和 sgRNA2 的退火片段分别连接到 *BbsI* 酶切后的线性化载体 pMD18T-U63-BsmB1 上。经过转化实验,筛选得到两个连接成功的质粒,pMD18T-U63-*Ppa*-sgRNA1 和 pMD18T-U63-*Ppa*-sgRNA2。通过 PCR 扩增给 U63-*Ppa*-sgRNA1 和 U63-*Ppa*-sgRNA2 添加接头序列。利用 Golden-gate 连接将两段由 U63 启动子驱动的 sgRNA 连接到中间

表 2 本研究中所用的引物序列

Table 2 The sequences of primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>Ppa</i> -sgRNA1-F	gtcgCGGATCCGGGAGCAACGGAG
<i>Ppa</i> -sgRNA1-R	aaacCTCCGTTGCTCCCGGATCCG
<i>Ppa</i> -sgRNA2-F	gtcgTCAGGTTTGACCCGCATGGC
<i>Ppa</i> -sgRNA2-R	aaacGCCATGCGGTGCAAACCTGA
<i>Ppa</i> -chk-F	CCCTTCCATCATCAAACA
<i>Ppa</i> -chk-R	GAACGCCCAGGACCAAAT

载体 PCR/TOPO/GW-*BsaI*-Bb。最后将组装好的质粒通过 LR 反应重组连接,得到 pUAST-attB-*Ppa*-sgRNAs 表达载体。

1.5 突变体鉴定与脂滴表型分析

将构建的 pUAST-attB-*Ppa*-sgRNA 质粒送至珠海联合华益公司进行显微注射,得到转基因果蝇 *Ppa*-sgRNA。将 *Ppa*-sgRNA 与表达 Cas9 蛋白的果蝇杂交,后代中得到同时表达 Cas9 蛋白与 sgRNA 的果蝇。使用 *Ppa*-chk-F 和 *Ppa*-chk-R 进行 Founder 的 PCR 鉴定,通过杂交得到纯合的突变果蝇,并通过 PCR 扩增和 DNA 测序比对确定突变位点。具体的杂交策略如图 1 所示。

研究选取了两株突变体 *Ppa*¹ 和 *Ppa*² 以及两者的杂交后代 *Ppa*¹/*Ppa*² 进行分析,解剖获得 3 龄幼虫的脂肪体,使用 DAPI 和 BODIPY 493/503 标记细胞核和脂滴,激光共聚焦显微镜下扫描成像。通过 Image-Pro Plus 6.0 软件对特定面积内(143 μm×143 μm)的不同直径脂滴进行数量统计,对照组与实验组各选取 3 个样本进行统计。通过 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析并绘制统计图。

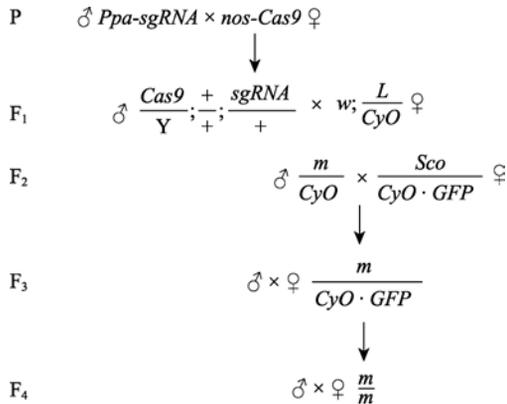


图 1 利用 CRISPR/Cas9 技术的基因敲除杂交策略
Fig. 1 The gene knockout strategy mediated by CRISPR/Cas9

1.6 超量表达 *Ppa* 的脂滴表型分析

T-A 克隆 *Ppa-RA/RC* 的编码区, 通过 *EcoR I* 和 *Kpn I* 连接至 pUAST-attB, 获得了转基因果蝇 *UAS-Ppa-RA/RC*。29°C 下, 利用 *da-Gal4* 驱动 *UAS-Ppa-RA/RC* 的全身表达, 解剖 3 龄幼虫的脂肪体, 使用 DAPI 和 Nile red 染色标记细胞核和脂滴, 激光共聚焦显微镜下扫描成像。通过 Image-Pro Plus 6.0 软件对特定面积内 (143 $\mu\text{m} \times 143 \mu\text{m}$) 的不同直径脂滴进行数量统计, 对照组与实验组各选取 3 个样本进行统计。通过 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析并绘制统计图。

1.7 基因挽救实验

通过遗传操作, 构建得到 *Ppa¹; da>UAS-Ppa-RA/RC* 的果蝇。29°C 下, 在突变体 *Ppa¹* 中利用 *da-Gal4* 驱动 *UAS-Ppa-RA/RC* 的全身表达, 解剖 3 龄幼虫的脂肪体, 使用 DAPI 和 BODIPY 493/503 染色标记细胞核和脂滴, 激光共聚焦显微镜扫描成像。

2 结果与分析

2.1 PPA 融合荧光蛋白定位于细胞核

在前期工作中, 发现超量表达 *Ppa* 能够增强果蝇唾液腺的异位脂肪累积。本研究首先通过与绿色荧光蛋白融合表达, 对 PPA 的定位进行分析。经查

Flybase 得知, *Ppa* 基因具有 3 个转录本, 其中 RA 和 RC 具有相同的编码区, RA 与 RB 的 mRNA 序列一致, 且 RB 的编码区在 RA/RC 的基础上越过了一个终止密码子 UGA。本研究克隆了 *Ppa-RA/RC* 的编码区, 构建了融合蛋白表达载体并得到转基因果蝇 *UAS-Ppa-RA/RC-eGFP*。通过 *da-Gal4* 驱动 *UAS-Ppa-RA/RC-eGFP* 的全身表达, 发现 PPA-PA/PC 在 3 龄幼虫唾液腺的细胞核中检测出强烈的荧光信号(图 2A), 并在 3 龄幼虫脂肪体的细胞核中检测出较弱的荧光信号(图 2B), 表明 *Ppa* 可能参与脂质代谢。

2.2 *Ppa* 缺失突变体的获得与脂滴表型分析

为了进一步探究 *Ppa* 对脂肪代谢的影响, 本研究利用 CRISPR/Cas9 技术构建基因缺失突变体。首先, 构建了 attB-*Ppa-sgRNA* 表达载体, 通过显微注射得到表达 *sgRNA* 的转基因果蝇 *Ppa-sgRNA*。将 *Ppa-sgRNA* 与表达 Cas9 蛋白的果蝇杂交, 对 *Ppa* 进行基因敲除。通过对杂交后代的遗传筛选和 PCR 鉴定, 得到了两株纯合可活的缺失突变体 *Ppa¹* 和 *Ppa²*, 具体策略详见材料与方法。随后对突变体进行测序鉴定, 发现 *Ppa¹* 缺失了 445 bp, *Ppa²* 缺失了 446 bp, 如图 3 所示, 缺失的片段位于编码区的前端。

通过 BODIPY 对 3 龄幼虫脂肪体中的脂滴进行染色标记, 发现与对照组 *w¹¹¹⁸* 相比, 突变体 *Ppa¹* 和 *Ppa²* 中的脂滴明显减小(图 4: A~C)。在对照组中观察到直径较大的大脂滴, 但在突变体中则表现为小脂滴的增加。由于 CRISPR/Cas9 技术具有潜在的脱靶效应, 故本研究对两个片段缺失等位基因的反式杂合突变体 *Ppa¹/Ppa²* 的脂滴进行了分析, 以消除遗传背景上的其他未知突变对表型的影响, 研究发现 *Ppa¹/Ppa²* 的脂滴较对照组明显减小, 小脂滴数量明显增多(图 4D)。随后对特定面积内不同直径的脂滴进行统计, 发现不同直径的脂滴所占的比例具有显著差异。与对照组相比, 突变体表现出 10 μm 以上大脂滴减少(图 4F)。为了进一步验证突变体中脂滴减小的表型, 随后在突变体 *Ppa¹* 中超量表达 *Ppa*, 发现脂滴较突变体明显增大, 但较对照组无显著差异(图 4: E 和 F), 说明 *Ppa* 能够回复突变体中脂滴减小的表型, 并且提示 *Ppa* 的缺失是导致脂滴减小的原因, 也进一步揭示了 *Ppa* 参与脂肪储存的调控。

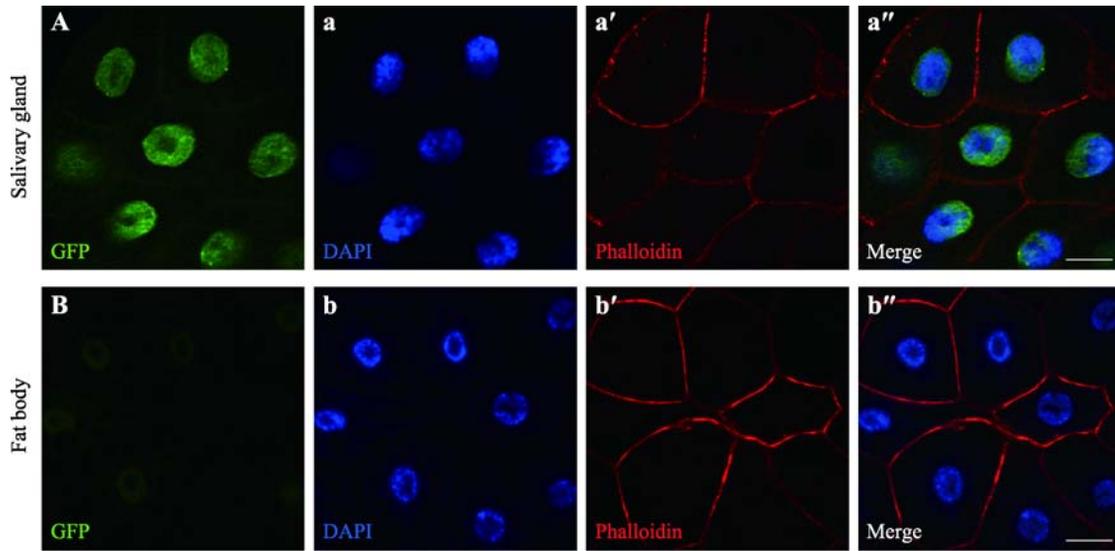


图 2 PPA-GFP 在 3 龄幼虫中的亚细胞定位

Fig. 2 Subcellular localization of PPA-GFP in the 3rd instar larvae

使用 *da-Gal4* 驱动 *UAS-Ppa-RA/RC-eGFP* 的全身表达。A: 唾液腺的 GFP 信号; a: 唾液腺的细胞核染色; a': 唾液腺的细胞骨架染色; a'': 唾液腺的荧光信号合并图。B: 脂肪体的 GFP 信号; b: 脂肪体的细胞核染色; b': 脂肪体的细胞骨架染色; b'': 脂肪体的荧光信号合并图。DAPI (蓝色): 细胞核染色; GFP (绿色): PPA-GFP 的融合荧光蛋白; Phalloidin (红色): 细胞骨架染色; Salivary gland: 唾液腺; Fat body: 脂肪体。标尺: 25 μm 。

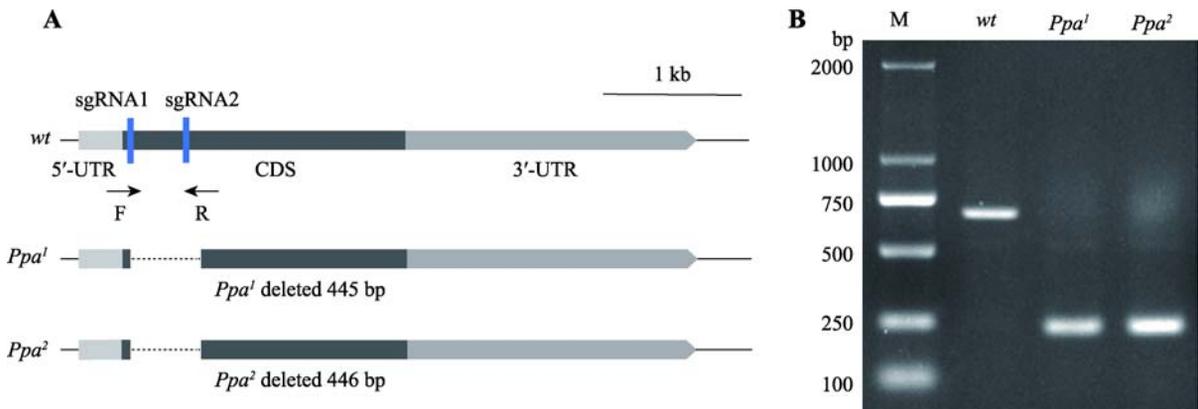


图 3 突变体中的缺失区域示意图与 PCR 扩增凝胶电泳图

Fig. 3 The schematic diagram of deletion regions in mutants and gel electrophoresis of PCR amplification

A: 突变体缺失区域示意图。 *Ppa* 只有一个外显子, 蓝色方框表示 sgRNA 位点, 虚线表示缺失片段。B: 突变体的 PCR 扩增结果(使用检测引物 *Ppa-chk-F* 和 *Ppa-chk-R* 进行鉴定)。M: 2 kb DNA marker; wt: 对照组(*w¹¹¹⁸*); *Ppa¹* 和 *Ppa²*: 片段缺失等位基因。

2.3 超量表达 *Ppa* 增强脂滴储存的能力

为了进一步验证 *Ppa* 在脂肪储存中的作用, 本研究检测了超量表达 *Ppa* 对脂滴的影响。使用 Nile red 对 3 龄幼虫脂肪体中的脂滴进行染色标记, 发现与对照组 *da-Gal4* 相比, 超量表达 *Ppa-RA/RC* 导致脂滴直径明显增加, 表现为大脂滴的数量显著增多

(图 5: A 和 B)。针对脂滴大小的差异, 统计了特定面积内不同直径脂滴的分布比例, 与对照组相比, 超量表达 *Ppa-RA/RC* 表现出直径 10 μm 以上的大脂滴比例明显增加, 而 1~5 μm 的小脂滴比例明显减少(图 5C), 表明超量表达 *Ppa* 能够导致脂肪体中小脂滴减少和大脂滴增加。

综上所述, 本研究通过亚细胞定位分析, 发现

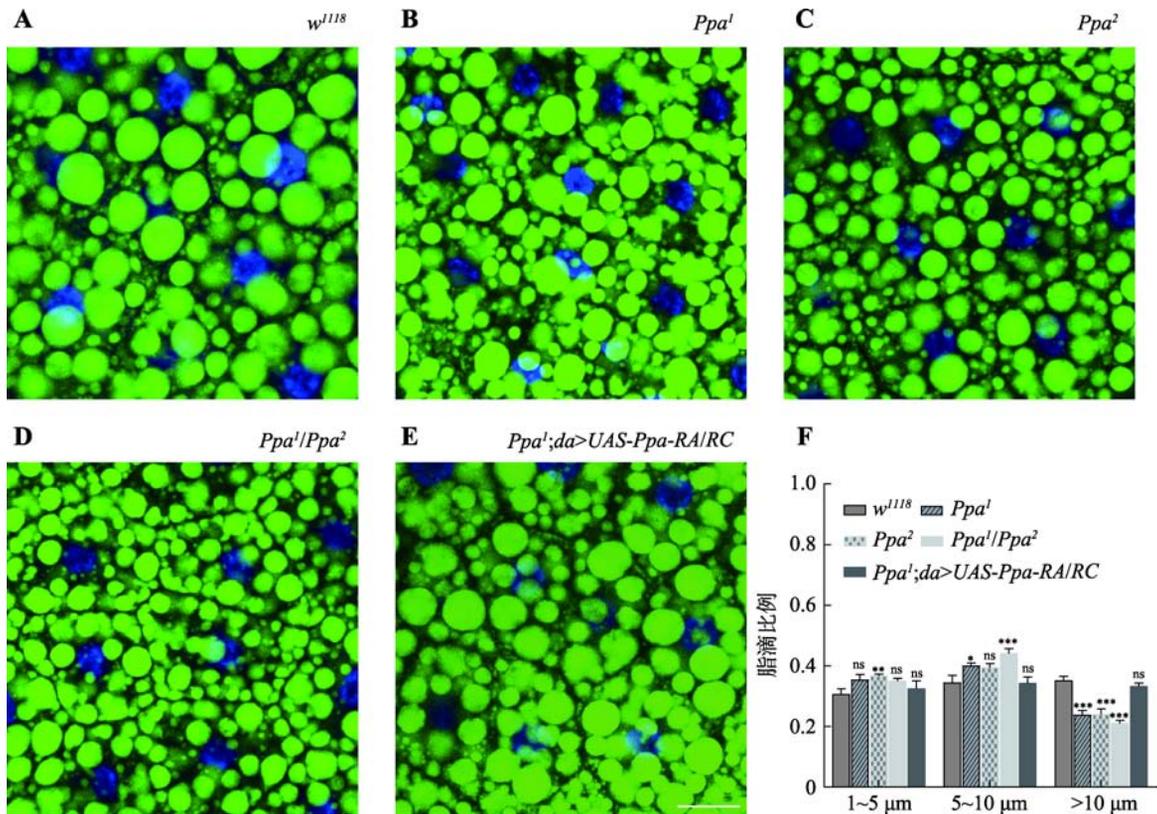


图 4 *Ppa* 缺失突变体在 3 龄幼虫中的脂滴直径变小

Fig. 4 *Ppa* deletion mutant exhibited smaller lipid droplets in the 3rd instar larvae

A~E: 3 龄幼虫的脂滴染色图。 *w¹¹¹⁸*: 对照组; *Ppa¹* 和 *Ppa²*: 片段缺失等位基因; *Ppa¹/Ppa²*: 两个等位基因的反式突变体; *Ppa¹; da>UAS-Ppa-RA/RC*: 突变体中过量表达 *Ppa*; BODIPY (绿色): 脂滴染色; DAPI (蓝色): 细胞核染色。 F: 特定面积内 (143 μm × 143 μm) 不同直径脂滴的分布比例统计图。 X 轴是脂滴直径 (μm), Y 轴为特定面积内不同直径的脂滴所占的比例。 1~5 μm: 直径 1~5 μm 的脂滴; 5~10 μm: 直径 5~10 μm 的脂滴; >10 μm: 直径 10 μm 以上的脂滴。 ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。 标尺: 25 μm。

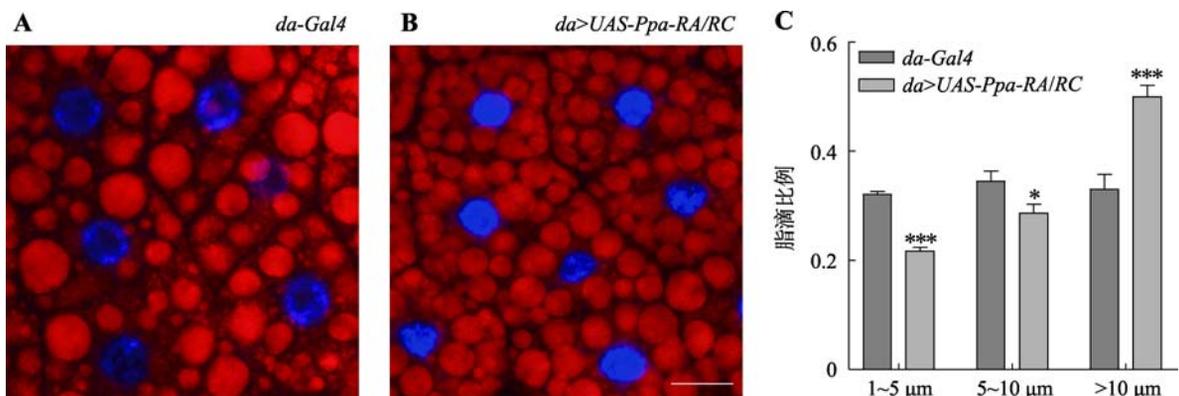


图 5 过量表达 *Ppa* 导致 3 龄幼虫中的脂滴大小增加

Fig. 5 Overexpression of *Ppa* led to increased sizes of lipid droplets in the 3rd instar larvae

A、B: 29°C 下, *da-Gal4* 和 *da>UAS-Ppa-RA/RC* 的 3 龄幼虫的脂滴染色图。 Nile red (红色): 脂滴染色; DAPI (蓝色): 细胞核染色。 C: 特定面积内 (143 μm × 143 μm) 不同直径脂滴的分布比例统计图。 X 轴是脂滴直径 (μm), Y 轴为特定面积内不同直径的脂滴所占的比例。 1~5 μm: 直径 1~5 μm 的脂滴; 5~10 μm: 直径 5~10 μm 的脂滴; >10 μm: 直径 10 μm 以上的脂滴。 *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$ 。 标尺: 25 μm。

Ppa 定位于唾液腺与脂肪体的细胞核中; 通过 *Ppa* 缺失突变体的脂滴形态分析, 发现脂滴较对照组表现为直径变小; 通过超量表达 *Ppa*, 发现脂肪体中的脂滴较对照组表现为直径增加, 并且突变体中超量表达 *Ppa* 能够将突变体的脂滴减小表型回复至野生型状态。以上结果表明 *Ppa* 具有促进脂肪储存的作用。

3 讨论

在小鼠(*Mus musculus*)中, F-box 基因家族成员 *Fbxw7* 的缺失引发了高血糖和胰岛素抵抗; 同时, 在小鼠肝脏中超量表达 *Fbxw7* 不仅能够显著抑制高脂喂养引发的胰岛素抵抗, 而且可以降低肥胖小鼠的高血糖^[20,21]; 人体细胞周期素依赖性激酶抑制蛋白(CDKIs)成员 p27 的缺失导致脂肪细胞数量的增加, F-box 蛋白 S 期激酶 *Skp2* 能够识别 p27 并对其降解; 并且在 *Skp2* 的基因敲除小鼠中, 皮下细胞和内脏的脂肪细胞数量下降了 50%, 表明 *Skp2* 具有促进脂肪的作用^[22]。在本研究中, 选取了 F-box 家族成员 *PPA* 作为研究对象, 发现 *Ppa* 片段缺失突变体表现为小脂滴增多, 而超量表达 *Ppa* 导致大脂滴增加, 并且突变体中超量表达 *Ppa* 能够回复突变体脂滴减小的表型, 这与 *Skp2* 的作用是相似的, 表明了 F-box 家族蛋白确实参与了脂质代谢调控。

一般而言, F-box 蛋白通过泛素-蛋白酶体途径介导靶蛋白的降解, 目前已报道的 *Ppa* 靶蛋白包括转录因子 *Prd* 和着丝粒组蛋白 *CID*, 它们调控着体节发育和着丝粒定位^[17,19], 但未见报道与脂肪相关的靶蛋白。已有的研究表明, 在 HeLa 细胞中敲除 E3 泛素连接酶编码基因 *MARCHF6* 导致脂滴丰度增加, *MARCHF6* 的泛素化底物包括 *Perilipin2* (*PLIN2*)、胆固醇转运蛋白 *NPC1* 和胆固醇合成限速酶 *LDM*, 这些蛋白直接参与脂滴组成或胆固醇合成^[23,24]。此外, 泛素-蛋白酶体途径参与调控脂质代谢通路的多个关键酶。在小鼠肝脏中, 脂肪甘油三酯脂酶 *ATGL* 是一种主要的甘油三酯分解酶, 能够将甘油三酯分解成游离脂肪酸。研究表明, E3 泛素连接酶 *COP1* 靶向降解 *ATGL*, *Cop1* 敲除小鼠的脂滴数量显著减少, 而超量表达 *Cop1* 引发小鼠脂滴数量的增加, 表

明 *COP1* 的功能是抑制脂肪分解^[25]。此外, 在奶牛乳腺上皮细胞中抑制蛋白酶体活性后, 乙酰辅酶 A 羧化酶 *ACC* 的 mRNA 表达量显著下调, 但脂肪酸合成酶 *FASN* 的 mRNA 表达量显著上调, 说明泛素蛋白酶体途径能够调控脂肪酸合成^[26]。*Ppa* 作为 SCF 泛素化复合体的组分, 具有富亮氨酸重复序列, 该结构域能够识别底物蛋白, 推测其底物蛋白可能与脂质合成或者脂滴结构形成相关。也有研究报道, F-box 蛋白可以与其他蛋白结合形成复合体发挥作用, 在酿酒酵母中, F-box 蛋白 *Ctf13* 与 *Skp1*、*Cep3* 形成核心, 这个由 3 种蛋白组成的核心与 *Ndc10* 结合, 形成着丝粒复合体 *CBF3*, 该复合体对动粒的组装至关重要^[9,27]。本研究发现 *Ppa* 具有促进脂肪储存的功能, 而其下游的调控网络还有待进一步研究。

致谢:

感谢中国科学院遗传与发育生物学研究所黄勋研究员提供的果蝇工具株和表达载体; 感谢广州霍夫曼免疫研究所焦仁杰教授和四川大学华西医院陈海洋教授提供的 sgRNA 载体构建和基因敲除方案。

参考文献(References):

- [1] Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S. Lipid classification, structures and tools. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1118 (11): 637-647. [DOI]
- [2] Welte MA, Gould AP. Lipid droplet functions beyond energy storage. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017, 1862(10 Pt B): 1260-1272. [DOI]
- [3] Welte MA. Expanding roles for lipid droplets. *Curr Biol*, 2015, 25(11): R470-R481. [DOI]
- [4] Filipe A, Mclauchlan J. Hepatitis C virus and lipid droplets: finding a niche. *Trends Mol Med*, 2015, 21(1): 34-42. [DOI]
- [5] Inloes JM, Hsu KL, Dix MM, Viader A, Masuda K, Takei T, Wood MR, Cravatt BF. The hereditary spastic paraplegia-related enzyme *DDHD2* is a principal brain triglyceride lipase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(41): 14924-14929. [DOI]
- [6] Xu X, Park JG, So JS, Lee AH. Transcriptional activation of *Fsp27* by the liver-enriched transcription factor *CREBH* promotes lipid droplet growth and hepatic steatosis. *Hepatology*, 2015, 61(3): 857-869. [DOI]
- [7] Wilfling F, Wang HJ, Haas JT, Kraemer N, Gould TJ,

- Uchida A, Cheng JX, Graham M, Christiano R, Fröhlich F, Liu XR, Buhman KK, Coleman RA, Bewersdorf J, Farese RV, Walther TC. Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER to lipid droplets. *Dev Cell*, 2013, 24(4): 384–399. [DOI]
- [8] Krahmer N, Guo Y, Wilfling F, Hilger M, Lingrell S, Heger K, Newman HW, Schmidt-suppran M, Vance DE, Mann M, Farese RV, Walther TC. Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *Cell Metab*, 2011, 14(4): 504–515. [DOI]
- [9] Wang XY, Sun LP, Zhang JF, Li H, Lv WQ, Zhang QQ. F-box proteins and their functions. *Chin Bull Life Sci*, 2008, 20(5): 807–811.
王秀燕, 孙莉萍, 张建锋, 李辉, 吕文清, 张其清. F-Box 蛋白家族及其功能. *生命科学*, 2008, 20(5): 807–811. [DOI]
- [10] Kipreos ET, Pagano M. The F-box protein family. *Genome Biol*, 2000, 1(5): REVIEWS3002. [DOI]
- [11] 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]
- [12] Xie CM, Wei WY, Sun Y. Role of SKP1-CUL1-F-box-protein (SCF) E3 ubiquitin ligases in skin cancer. *J Genet Genomics*, 2013, 40(3): 97–106. [DOI]
- [13] Sohn JH, Lee YK, Han JS, Jeon YG, Kim JI, Choe SS, Kim SJ, Yoo HJ, Kim JB. Perilipin 1 (Plin1) deficiency promotes inflammatory responses in lean adipose tissue through lipid dysregulation. *J Biol Chem*, 2018, 293(36): 13974–13988. [DOI]
- [14] Ju LP, Han JF, Zhang XY, Deng YJ, Yan H, Wang CR, Li XH, Chen SQ, Alimujiang M, Li X, Fang QC, Yang Y, Jia WP. Obesity-associated inflammation triggers an autophagy-lysosomal response in adipocytes and causes degradation of perilipin 1. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 121. [DOI]
- [15] Dui W, Lu W, Ma J, Jiao RJ. A systematic phenotypic screen of F-box genes through a tissue-specific RNAi-based approach in *Drosophila*. *J Genet Genomics*, 2012, 39(8): 397–413. [DOI]
- [16] Clark E, Akam M. Odd-paired controls frequency doubling in *Drosophila* segmentation by altering the pair-rule gene regulatory network. *eLife*, 2016, 5: e18215. [DOI]
- [17] Raj L, Vivekanand P, Das TK, Badam E, Fernandes M, Finley RL, Brent R, Appel LF, Hanes SD, Weir M. Targeted localized degradation of Paired protein in *Drosophila* development. *Curr Biol*, 2000, 10(20): 1265–1272. [DOI]
- [18] Heun P, Erhardt S, Blower MD, Weiss S, Skora AD, Karpen GH. Mislocalization of the *Drosophila* centromere-specific histone CID promotes formation of functional ectopic kinetochores. *Dev Cell*, 2006, 10(3): 303–315. [DOI]
- [19] Moreno-moreno O, Medina-giró S, Torras-llort M, Azorín F. The F box protein partner of paired regulates stability of *Drosophila* centromeric histone H3, CenH3(CID). *Curr Biol*, 2011, 21(17): 1488–1493. [DOI]
- [20] Zhao JJ, Xiong XL, Li Y, Liu X, Wang T, Zhang H, Jiao Y, Jiang JJ, Zhang HJ, Tang QQ, Gao X, Li XJ, Lu Y, Liu B, Hu C, Li XY. Hepatic F-box protein FBXW7 maintains glucose homeostasis through degradation of fetuin-A. *Diabetes*, 2018, 67(5): 818–830. [DOI]
- [21] Zhang C, Chen F, Feng L, Shan Q, Zheng GH, Wang YJ, Lu J, Fan SH, Sun CH, Wu DM, Li MQ, Hu B, Wang QQ, Zhang ZF, Zheng YL. FBXW7 suppresses HMGB1-mediated innate immune signaling to attenuate hepatic inflammation and insulin resistance in a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease. *Mol Med*, 2019, 25(1): 29. [DOI]
- [22] Cooke PS, Holsberger DR, Cimafranca MA, Meling DD, Beals CM, Nakayama K, Nakayama KI, Kiyokawa H. The F box protein S phase kinase-associated protein 2 regulates adipose mass and adipocyte number *in vivo*. *Obesity (Silver Spring)*, 2007, 15(6): 1400–1408. [DOI]
- [23] Scott NA, Sharpe LJ, Capell-Hattam IM, Gullo SJ, Luu W, Brown AJ. The E3 ubiquitin ligase MARCH6 as a metabolic integrator in cholesterol synthesis and beyond. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2021, 1866(1): 158837. [DOI]
- [24] Scott NA, Sharpe LJ, Capell-hattam IM, Gullo SJ, Luu W, Brown AJ. The cholesterol synthesis enzyme lanosterol 14 α -demethylase is post-translationally regulated by the E3 ubiquitin ligase MARCH6. *Biochem J*, 2020, 477(2): 541–555. [DOI]
- [25] Ghosh M, Niyogi S, Bhattacharyya M, Adak M, Nayak DK, Chakrabarti S, Chakrabarti P. Ubiquitin ligase COP1 controls hepatic fat metabolism by targeting ATGL for degradation. *Diabetes*, 2016, 65(12): 3561–3572. [DOI]
- [26] Liu LL, Guo AW, Li QQ, Wu PF, Yang YJ, Chen FF, Li SH, Guo PJ, Zhang Q. The regulation of ubiquitination in milk fat synthesis in bovine. *Hereditas(Beijing)*, 2020, 42(6): 548–555.
刘莉莉, 郭爱伟, 李青青, 吴培福, 杨亚晋, 陈粉粉, 李素华, 郭盘江, 张勤. 泛素化途径在奶牛乳脂生成过程中的调控作用. *遗传*, 2020, 42(6): 548–555. [DOI]
- [27] Leber V, Nans A, Singleton MR. Structural basis for assembly of the CBF3 kinetochore complex. *EMBO J*, 2018, 37(2): 269–281. [DOI]