

李云蕾, 李明泽, 李健, 等. 猪泛素化底物蛋白 ZFC3H1 的生物信息学与相分离能力分析及其对骨骼肌发育的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (11): 8-17.

LI Y L, LI M Z, LI J, et al. Bioinformatics and phase separation capacity analysis of the ubiquitinated substrate protein ZFC3H1 and its effect on skeletal muscle development [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (11): 8-17.

# 猪泛素化底物蛋白 ZFC3H1 的生物信息学与相分离能力分析 及其对骨骼肌发育的影响

李云蕾<sup>1</sup>, 李明泽<sup>1</sup>, 李健<sup>1</sup>, 刘亚星<sup>1</sup>, 艾子凯<sup>1</sup>, 张运<sup>1</sup>, 姚一龙<sup>2</sup>, 贾斌<sup>1\*</sup>, 张永生<sup>1\*</sup>

(1. 石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832000;

2. 佛山鲲鹏现代农业研究院, 广东 佛山 528000)

**摘要:** 旨在探究猪肌肉发育的分子基础, 基于前期进行的泛素化蛋白组学测序 (4D-label 泛素化测序), 检测杜洛克猪和藏香猪腿肌样本的翻译后水平修饰, 分析两品种猪骨骼肌中编码泛素化底物蛋白的锌指 C3H1 型蛋白 (ZFC3H1) 的差异性基因。通过 UniPort、GeneCards、Ensembl 数据库查询 ZFC3H1 蛋白质序列并进行生物信息学分析, 使用 PLAAC 与 PONDR 进行相分离能力预测, 最后利用 ISwine 和 PigGTE<sub>x</sub> 统计与脂肪发育及产肉性状相关的数量性状基因座 (QTLs) 的数量关系。结果: ZFC3H1 蛋白为亲水蛋白, 含有 411 个磷酸化位点及 14 个糖基化位点, 不存在信号肽及跨膜区域, 主要分布在细胞核上, 二级结构预测结果显示  $\alpha$ -螺旋、无规卷曲和延伸链分别占 37.16%、62.33%、0.51%, 与三级结构预测一致; ZFC3H1 与微管相关蛋白 TREX 复合体亚基 (MTREX)、PNN 互作的丝氨酸/精氨酸富集蛋白 (PNISR)、含锌指 CCHC 结构域蛋白 7 (ZCCHC7)、细胞色素 c 氧化酶组装因子 (CMC1)、多聚腺苷酸结合蛋白核 1 (PABPN1) 等蛋白之间存在互作; 系统进化树显示, 该基因与非洲野猪亲缘关系最近, 同源率为 99.8%; 相分离能力预测及 QTLs 统计显示, ZFC3H1 的蛋白质结构中存在类朊病毒结构的蛋白序列和 9 个内在无序区域 (IDRs), 同时该基因含有 10 个有价值的表达数量性状基因座 (eQTLs), 且基因附近有 218 个长链非编码 RNA 表达数量性状基因座 (lncQTLs)。结论: 本试验成功证明 ZFC3H1 可形成生物凝聚体并驱动液-液相分离, 进而调控骨骼肌增殖。

**关键词:** 猪; 骨骼肌增殖; 泛素化底物蛋白; 液-液相分离; 生物信息学分析

中图分类号: S828 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)11-0008-10

## Bioinformatics and phase separation capacity analysis of the ubiquitinated substrate protein ZFC3H1 and its effect on skeletal muscle development

LI Yunlei<sup>1</sup>, LI Mingze<sup>1</sup>, LI Jian<sup>1</sup>, LIU Yaxing<sup>1</sup>, AI Zikai<sup>1</sup>, ZHANG Yun<sup>1</sup>, YAO Yilong<sup>2</sup>,

JIA Bin<sup>1\*</sup>, ZHANG Yongsheng<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, China;

2. Foshan Kunpeng Modern Agricultural Research Institute, Foshan 528000, China)

**Abstract:** The aim of this study was to delve into the molecular basis of porcine muscle development. Based on the previous ubiquitination proteomics sequencing (4D-label ubiquitination sequencing), the post-translational modifications of leg muscle samples from Duroc pigs and Tibetan pigs were detected, and the differential genes encoding the ubiquitinated substrate protein - zinc finger C3H1 - type protein (ZFC3H1) in the skeletal muscles of the two pig breeds were analyzed. Then, the protein sequence of ZFC3H1 was queried using UniPort, GeneCards and Ensembl databases for bioinformatics analysis. Next, PLAAC and PONDR were used to predict the phase separation ability. Finally, ISwine and PigGTE<sub>x</sub> were utilized to count the quantitative relationship between QTLs related to fat and meat production traits. The results showed that ZFC3H1 was a hydrophilic protein, containing 411 phosphorylation sites and 14 glycosylation sites, with no signal peptide or transmembrane region, and it was mainly distributed in the nucleus. The secondary structure prediction results indicated that  $\alpha$ -helix,

收稿日期: 2024-09-20; 修回日期: 2025-08-16

基金项目: 兵团科技计划项目 (KC2024CC007); 石河子大学高层次人才科研启动项目 (2022ZK022); 石河子大学创新合作专项 (QS2025008); 青年科学基金项目 (32302718); 石河子大学成果转化与技术推广计划项目 (2022032)

第一作者: 李云蕾, 女, 硕士研究生

\* 通信作者: 贾斌, 博士, 教授, 研究方向为分子遗传与抗病育种研究, E-mail: jiabin@shzu.edu.cn; 张永生, 博士, 副教授, 研究方向为动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: zhangyongsheng@shzu.edu.cn.

random coil, and extended chain account for 37.16%, 62.33%, and 0.51%, respectively; which was consistent with the tertiary structure prediction. ZFC3H1 interacted with proteins such as icotubule-associated protein TREX complex subunit (MTREX), peptidylprolyl cis-trans isomerase N1 domain-containing protein (PNISR), zinc finger CCHC domain-containing protein 7 (ZCCHC7), cytochrome c oxidase assembly factor (CMC1), and polyadenylate-binding protein nuclear 1 (PABPN1). The phylogenetic tree showed that this gene had the closest genetic relationship with the African wild boar, with a homology of 99.8%. The phase separation ability prediction and QTLs statistics showed that the protein structure of ZFC3H1 contained prion-like protein sequences and 9 intrinsically disordered regions (IDRs). Meanwhile, this gene contained 10 valuable expression quantitative trait loci (eQTLs), and there were 218 long non-coding RNA expression quantitative trait loci (lncQTLs) near the gene. It was successfully proven here that the effector ZFC3H1 was able to form biological condensates and to drive liquid-liquid phase separation so as to regulate skeletal muscle proliferation.

**Keywords:** pig; skeletal muscle proliferation; ubiquitinated substrate protein; liquid-liquid phase separation; bioinformatics analysis

我国是猪肉生产和消费大国。优化生猪产能调控,推动生物育种提速,加快自主品种选育是目前相关研究的重点。有研究表明,中外猪种在骨骼肌形成、肌肉沉积和代谢等方面存在显著差异<sup>[1-2]</sup>。相较于国外瘦肉型商品猪,我国的生猪品质优良,但产肉量制约了生猪性能。基于该现状,我国各研究团队在解析猪骨骼肌沉积的分子机制方面开展了大量探索。Liu等<sup>[3]</sup>利用多组学分析,揭示了不同品种猪骨骼肌沉积过程中大量的顺式调控元件和染色质可及性的差异。Li等<sup>[4]</sup>则通过染色质相互作用图谱和肉类生产相关性状的全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS),鉴定出大白猪和梅山猪在瘦肉率、料重比和平均日增重等性状相关的主要效应基因及其突变。杨亚岚<sup>[5]</sup>根据转录组学方法分析骨骼肌不同时期的发育情况,鉴定出影响肉产量的关键基因和转录因子,其发育的28个时期转录组图谱显示,骨骼肌细胞的增殖、分化和迁移表型与物种间的基因组变异有关<sup>[6]</sup>。

液-液相分离(liquid-liquid phase separation, LLPS)是指通过生物大分子(例如蛋白质和RNA)的凝缩作用,在细胞内形成的类似于液滴状的亚结构,其广泛存在于细胞核、细胞质和细胞器中,并参与应激反应、基因表达调控、信号转导等多种细胞生理过程<sup>[7-8]</sup>。2009年,Brangwynne等<sup>[9]</sup>首次在研究线虫性腺中RNA和P颗粒形成小球的过程中,发现细胞质中富含RNA和蛋白质的无膜细胞器P颗粒表现出类似液体的物质,之后通过融合、滴水和润湿这些特性估算其黏度和表面张力,P颗粒迅速出现溶解和凝结的现象,即“相分离”。此后生物界围绕“相分离”的研究逐步开展起来,作为重要的非细胞器生物调控模式,LLPS有着一个复杂的生物物理过程,其体系的任何性质如溶液的分子组成、温度、静电性质和黏弹性的改变,都可能影响相分离过程<sup>[10]</sup>。目

前,LLPS已被证明能通过调控基因表达影响骨骼肌发育,例如调节骨骼肌细胞大小的转录协同因子,具有PDZ结合基序的转录共激活因子(transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, TAZ)可通过相分离调节基因表达影响肌肉分化机制<sup>[11]</sup>。肌分化因子(myogenic differentiation antigen, MYOD)通过相分离调节染色质环的三维结构,从而影响骨骼肌细胞的增殖和肌肉生成<sup>[12]</sup>。因此,在骨骼肌发育方面,LLPS的研究有助于揭示传统方法无法观察到的微观级别的信号传递机制、基因表达调控以及细胞内各种组分之间的相互作用。

本研究基于前期对杜洛克猪和藏香猪骨骼肌组织泛素化蛋白组学测序,筛选出锌指C3H1型蛋白(zinc finger C3H1-type containing protein 1, ZFC3H1)。为探究猪骨骼肌发育的遗传机制,本研究对ZFC3H1进行生物信息学、相分离能力分析,旨在揭示ZFC3H1的分子结构、相分离能力及与骨骼肌发育表型的关系,以期为我国猪产肉量及其品质改良提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

在UniPort<sup>[13]</sup>蛋白质序列和功能注释数据库查找猪ZFC3H1氨基酸序列的相关信息,ZFC3H1蛋白的ID为A0A4X1VZX1,在Ensembl获得ZFC3H1基因相关信息,基因ID为ENSSSCG00000000509。之后通过多个软件进行生物信息学分析,使用PONDR<sup>[14-15]</sup>及PLAAC<sup>[16-17]</sup>数据库评估相分离潜力,通过PigGTE<sup>[18]</sup>及ISwine<sup>[19]</sup>数据库探究ZFC3H1对猪骨骼肌发育表型的影响。

### 1.2 分析软件及项目

使用相关软件及网站对ZFC3H1基因进行分析,分析软件及项目具体见表1。

表 1 分析软件及项目

分析软件	分析项目	网址
ProtParam	蛋白质理化性质分析	<a href="https://web.expasy.org/protparam">https://web.expasy.org/protparam</a>
ProtScale	蛋白质亲疏水性分析	<a href="https://web.expasy.org/protscale">https://web.expasy.org/protscale</a>
NetPhos 3.1	蛋白质磷酸化位点分析	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/</a>
NetNGlyc 1.0	蛋白质糖基化位点分析	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/</a>
SignalP 4.1	信号肽分析	<a href="http://www.dettaibio.com/tools/signal-peptide.html">http://www.dettaibio.com/tools/signal-peptide.html</a>
TMHMM 2.0	跨膜区域分析	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/</a>
WoLF PSORT	亚细胞定位分析	<a href="https://wolfsort.hgc.jp">https://wolfsort.hgc.jp</a>
MegAlign、MEGA 11.0	相似性比对、系统进化树	<a href="http://gsds.gao-lab.org/">http://gsds.gao-lab.org/</a> <a href="https://megasoftware.net/">https://megasoftware.net/</a>
GSDS 2.0	基因结构分析	<a href="http://gsds.gao-lab.org/">http://gsds.gao-lab.org/</a>
SOPMA	二级结构预测	<a href="http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl_page=npsa_sopma.html">http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl_page=npsa_sopma.html</a>
AlphaFold 3、PyMOL 3.0	三级结构预测	<a href="https://alphafoldserver.com/">https://alphafoldserver.com/</a> <a href="https://pymol.org/">https://pymol.org/</a>
STRING 10.5	蛋白互作网络分析	<a href="https://www.string-db.org/">https://www.string-db.org/</a>
PONDR、PLAAC	相分离能力预测	<a href="https://pondr.com">https://pondr.com</a> <a href="https://plaac.wi.mit.edu">https://plaac.wi.mit.edu</a>
PigGTEx、ISwine	猪脂肪发育及产肉性状相关的数量性状基因座 (QTLs) 统计与分析	<a href="https://piggtex.ipiginc.com/#/home">https://piggtex.ipiginc.com/#/home</a> <a href="http://iswine.iomics.pro">http://iswine.iomics.pro</a>

### 1.3 试验方法

将前期测序筛选得到的藏香猪与杜洛克猪的 762 个差异泛素化蛋白因子, 结合 CPLM 4.0<sup>[20]</sup>、GeneCards<sup>[21]</sup>、UniPort<sup>[22]</sup>、Ensembl<sup>[23]</sup> 数据库完成与骨骼肌发育相关的候选因子筛选, 明确猪骨骼肌差异性泛素化蛋白 ZFC3H1<sup>[24]</sup>。根据 GeneCards、UniProt、Ensembl 数据库获得 ZFC3H1 蛋白序列信息, 使用表 1 中相关软件进行生物信息学分析, 进一步了解并揭示该蛋白质分子水平的结构功能与作用机制。使用 PLAAC 与 PONDR 完成内在无序区域 (IDRs) 相变预测, 最后利用 ISwine 和 PigGTEx 在猪群体表型性状中找到 ZFC3H1 因子产肉相关性状, 探索泛素化底物蛋白相分离调控机制与骨骼肌发育表型的因果关系。

### 1.4 数据统计与分析

根据 ISwine 的 QTXs 统计 ZFC3H1 (基因 ID: ENSMUSCG0000000509) 与猪脂肪发育及产肉性状相关的 QTLs; 根据 PigGTEx 统计 ZFC3H1 与猪产肉性状相关 QTLs 数量。

## 2 结果与分析

### 2.1 ZFC3H1 的一般生物信息学分析

#### 2.1.1 蛋白质理化性质及亲疏水性预测

根据 ProtParam 软件对 ZFC3H1 理化性质进行预测。结果显示, 该蛋白分子式为 C<sub>9907</sub>H<sub>15769</sub>N<sub>2771</sub>O<sub>3057</sub>S<sub>64</sub>,

包括 1 975 个氨基酸, 其中异亮氨酸 (Ile) 占比最高, 为 10.4%; 酪氨酸 (Tyr) 占比最低, 为 1.0%; 其相对分子量为 224 661.76 Da, 原子总数为 31 568, 理论等电点为 8.28, 不稳定系数为 8.96, 属于不稳定蛋白 (表 2)。通过体外培养哺乳动物网状细胞检测到其半衰期为 30 h。根据 ProScale 对 ZFC3H1 进行亲疏水性分析, 结果显示, ZFC3H1 蛋白第 450、451、452 位分别为谷氨酸 (Glu)、精氨酸 (Arg)、Arg, 亲水性最强, 预测分值均为 -3.878; 第 1 899 位氨基酸为丙氨酸 (Ala), 疏水性最强, 分值为 +2.600; 总平均亲水性为 -0.714, 脂肪系数为 75.02, 推测该蛋白为亲水蛋白 (图 1)。

#### 2.1.2 蛋白质磷酸化位点与糖基化位点预测

根据 NetPhos 3.0 分析蛋白质磷酸化位点得知, ZFC3H1 有 411 个磷酸化位点, 高于阈值 (0.5) 的磷酸化位点包括 153 个丝氨酸 (Ser), 55 个苏氨酸 (Thr), 16 个 Tyr (图 2)。根据 NetNGlyc 1.0 分析蛋白质糖基化位点得知, ZFC3H1 蛋白有 14 个糖基化位点 (图 3)。值得注意的是磷酸化在泛素化蛋白质降解信号通路中起着非常重要的作用。

#### 2.1.3 信号肽与跨膜区域预测

根据 SignalP 5.0 分析信号肽得知, ZFC3H1 蛋白不含信号肽 (图 4)。根据 TMHMM2.0 分析跨膜区域得知, ZFC3H1 蛋白不存在跨膜区域, 为无跨膜区域蛋白 (图 5)。由此推测该蛋白属于非分泌蛋白。

表 2 猪 ZFC3H1 蛋白氨基酸组成

氨基酸	数量	比例/%	氨基酸	数量	比例/%
丙氨酸 (Ala, A)	114	5.8	精氨酸 (Arg, R)	115	5.8
谷氨酸 (Glu, E)	179	9.1	甘氨酸 (Gly, G)	80	4.1
组氨酸 (His, H)	32	1.6	蛋氨酸 (Met, M)	32	1.6
亮氨酸 (Leu, L)	206	10.4	赖氨酸 (Lys, K)	170	8.6
脯氨酸 (Pro, P)	127	6.4	丝氨酸 (Ser, S)	192	9.7
苏氨酸 (Thr, T)	89	4.5	色氨酸 (Trp, W)	20	1.0
酪氨酸 (Tyr, Y)	53	2.7	缬氨酸 (Val, V)	91	4.6
天冬酰胺 (Asn, N)	91	4.6	天冬氨酸 (Asp, D)	96	4.9
半胱氨酸 (Cys, C)	32	1.6	谷氨酰胺 (Gln, Q)	106	5.4
异亮氨酸 (Ile, I)	77	3.9	苯丙氨酸 (Phe, F)	73	3.7

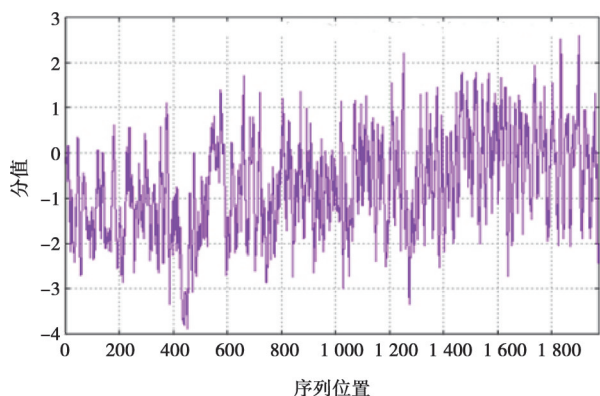


图 1 猪 ZFC3H1 蛋白亲、疏水性分析

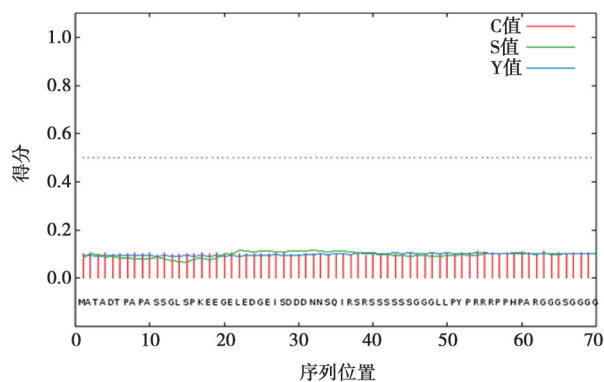


图 4 猪 ZFC3H1 蛋白信号肽分析

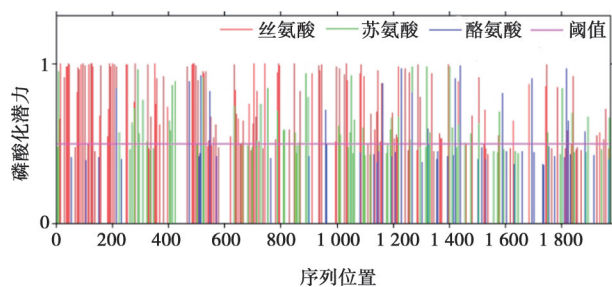


图 2 猪 ZFC3H1 蛋白磷酸化位点分析

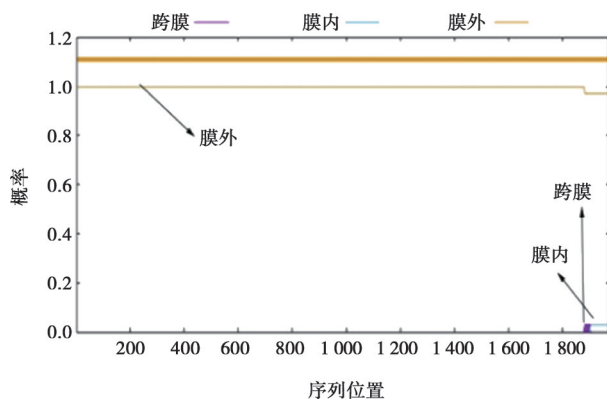


图 5 猪 ZFC3H1 蛋白跨膜区域分析

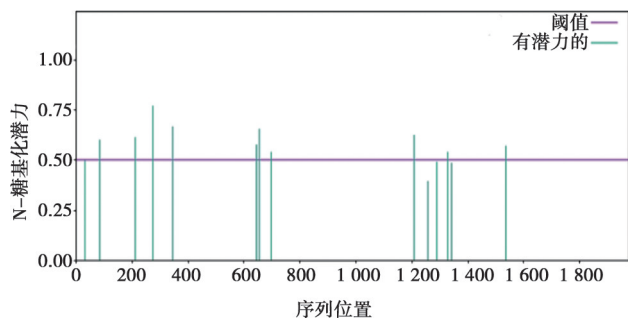


图 3 猪 ZFC3H1 蛋白 N-糖基化位点分析

### 2.1.4 亚细胞定位预测

根据 WoLF PSORT 软件对 ZFC3H1 蛋白亚细胞定位预测, 结果可知, ZFC3H1 蛋白主要分布在细胞核 (27.5%)、细胞质和细胞核 (16.5%)、细胞质 (4.5%) (图 6)。

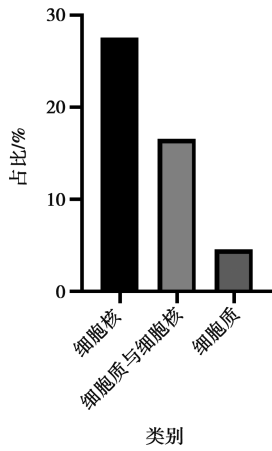


图 6 猪 ZFC3H1 蛋白亚细胞定位分析

		相似性/%											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
变异度/%	1	99.8	97.4	97.7	97.6	97.6	97.6	96.9	96.9	96.9	96.9	1	XP.020947660.1 家猪
	2	0.2	97.4	97.5	97.4	97.4	97.4	96.9	96.9	96.9	96.9	2	XP.047643157.1 非洲野猪
	3	2.6	2.7	97.6	97.6	97.6	97.6	97.7	97.6	97.6	97.6	3	XP.057597613.1 河马
	4	2.4	2.5	2.4	97.6	99.9	99.7	97.2	97.0	97.1	97.1	4	XP.006197891.1 羊驼
	5	2.5	2.6	2.4	0.2	100.0	99.9	97.2	97.0	97.1	97.1	5	XP.006191168.1 双峰野骆驼
	6	2.5	2.6	2.4	0.2	0.0	99.9	97.2	97.0	97.1	97.1	6	XP.045375416.1 双峰骆驼
	7	2.5	2.6	2.4	0.3	0.1	0.1	97.2	97.0	97.1	97.1	7	XP.010986524.1 单峰骆驼
	8	3.1	3.2	2.4	2.9	2.9	2.9	2.9	98.9	98.9	98.9	8	XP.055250065.1 原麝
	9	3.1	3.2	2.4	3.0	3.0	3.0	3.0	1.1	99.3	99.3	9	XP.003586079.1 牛
	10	3.1	3.2	2.4	3.0	3.0	3.0	3.0	1.1	0.7	10	XP.017903047.1 山羊	

图 7 偶蹄目动物 ZFC3H1 氨基酸序列相似性对比

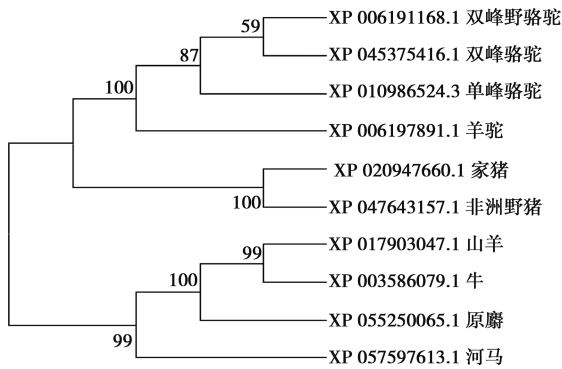


图 8 猪 ZFC3H1 蛋白系统进化树分析

### 2.1.5 相似性比对及系统进化树的构建

根据 DNASTar 软件 MegAlign 对与猪同源的 10 种偶蹄目代表动物的 ZFC3H1 蛋白进行相似性比对。结果显示，与猪 ZFC3H1 蛋白同源性最高的是非洲野猪，同源性达 99.8%，与河马、羊驼、双峰野骆驼、双峰骆驼、单峰骆驼、原麝、牛、山羊的同源性依次为 97.4%、97.7%、97.6%、97.6%、97.6%、96.9%、96.9%、96.9%（图 7），说明该蛋白在物种进化中具有较强的保守性。系统进化树显示，该进化树分为五大类群，分别为骆驼科、猪科、牛科、麝科、河马科，其中猪与猪科中的非洲野猪亲缘关系最近，与麝科中的原麝、牛科中的牛和山羊的遗传距离最远（图 8）。

### 2.1.6 基因结构分析

根据 GSDS 2.0 对 2.1.5 中系统进化树的 10 个物种进行基因结构分析，其上游序列、编码序列、非编码序列以及下游序列如图 9 所示。

### 2.1.7 ZFC3H1 蛋白二级结构及三级结构预测

根据 SOPMA 预测得知，该蛋白质  $\alpha$ -螺旋占 37.16%，无规卷曲占 62.33%，延伸链占 0.51%，与使用 AlphaFold、PyMOL 对 ZFC3H1 蛋白三级结构进行预测结果一致（图 10）。ZFC3H1 蛋白三级结构及发生相分离的区域如图 11 所示。

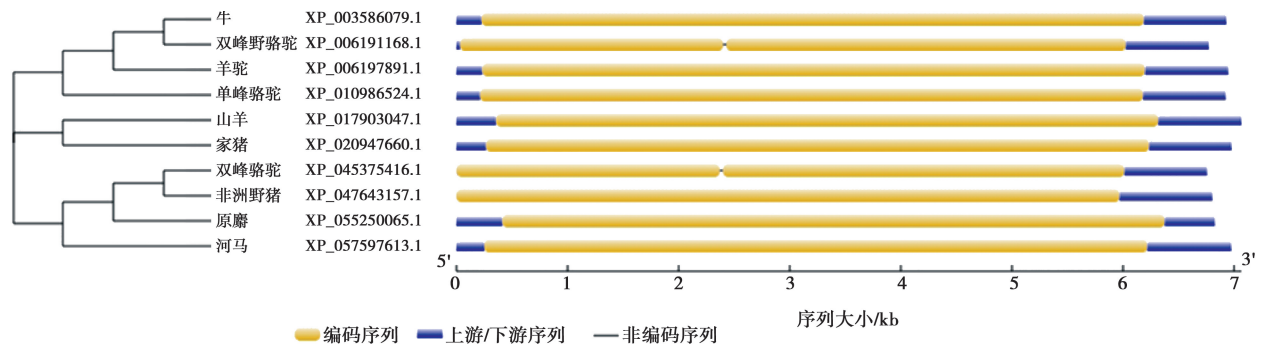


图 9 10 个物种 ZFC3H1 基因结构分析

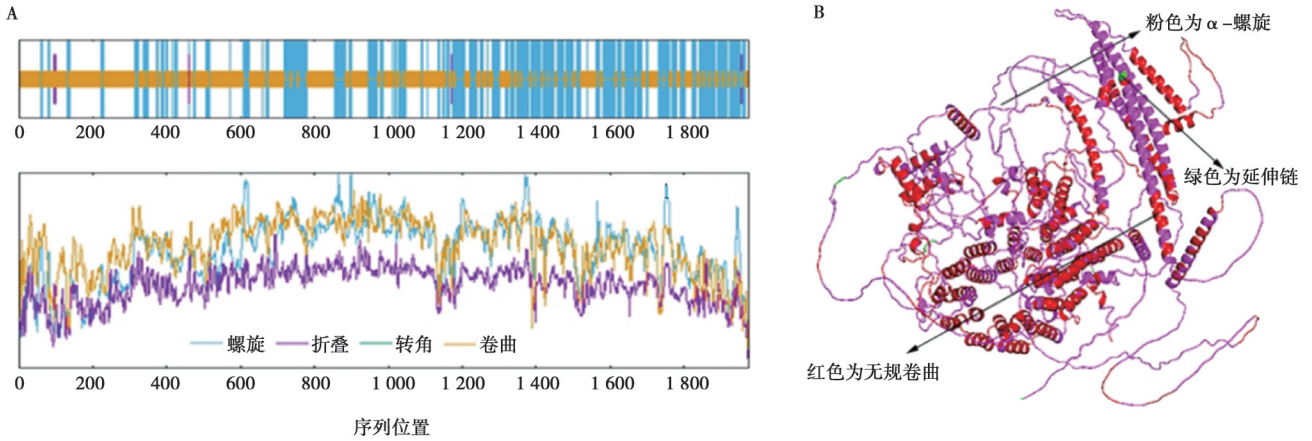


图 10 猪 ZFC3H1 蛋白二、三级结构预测



图 11 猪 ZFC3H1 蛋白三级结构及发生相分离预测

### 2.1.8 蛋白互作网络预测

根据 STRING 数据库在置信度为 70% 的条件下构建猪 ZFC3H1 互作蛋白网络图，结果显示，该蛋白互作网络共有 11 个节点、18 条边，平均节点度为 3.27，平均局部聚类系数为 0.898，ZFC3H1 蛋白主要与微管相关蛋白 TREX 复合体亚基 (MTREX)、PNN 互作的丝氨酸/精氨酸富集蛋白 (PNISR)、含锌指 CCHC 结构域蛋白 7 (ZCCHC7)、细胞色素 c 氧化酶组装因子 (CMC1)、多聚腺苷酸结合蛋白核 1 (PABPN1)、剪接因子 3B 亚基 1 (SF3B1)、DIS3 样核糖核酸酶 (DIS3L) 等蛋白之间存在互作 (图 12)。

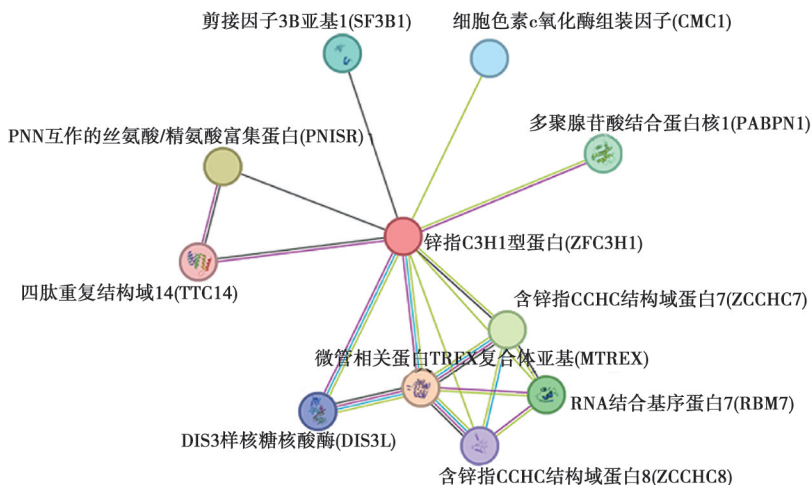


图 12 猪 ZFC3H1 蛋白互作网络

## 2.2 ZFC3H1 蛋白相分离能力及性状分析与统计

根据在线网站 PLAAC 与 PONDR 输入 ZFC3H1 蛋白质序列对其相分离能力进行分析。结果发现 ZFC3H1 存在有类朊病毒结构的蛋白序列 (此蛋白序列与 LCR 关系密切) (图 13) 和 9 个 IDRs 区域 (图

14)。根据 ISwine 寻找 ZFC3H1 与猪脂肪发育及产肉性状相关的 QTLs，结果发现共有 21 个相关性状 QTLs (表 3)。根据 PigGTE<sub>x</sub> 对 ZFC3H1 与猪产肉性状相关 QTLs 数量进行统计，结果显示，该基因含有 10 个有价值的表达数量性状基因座 (eQTLs)，并且

该基因附近有 218 个长链非编码 RNA 表达数量性状基因座 (lncQTLs) (表 4), 大量有价值的 QTLs 区域

与骨骼肌增殖密切相关。

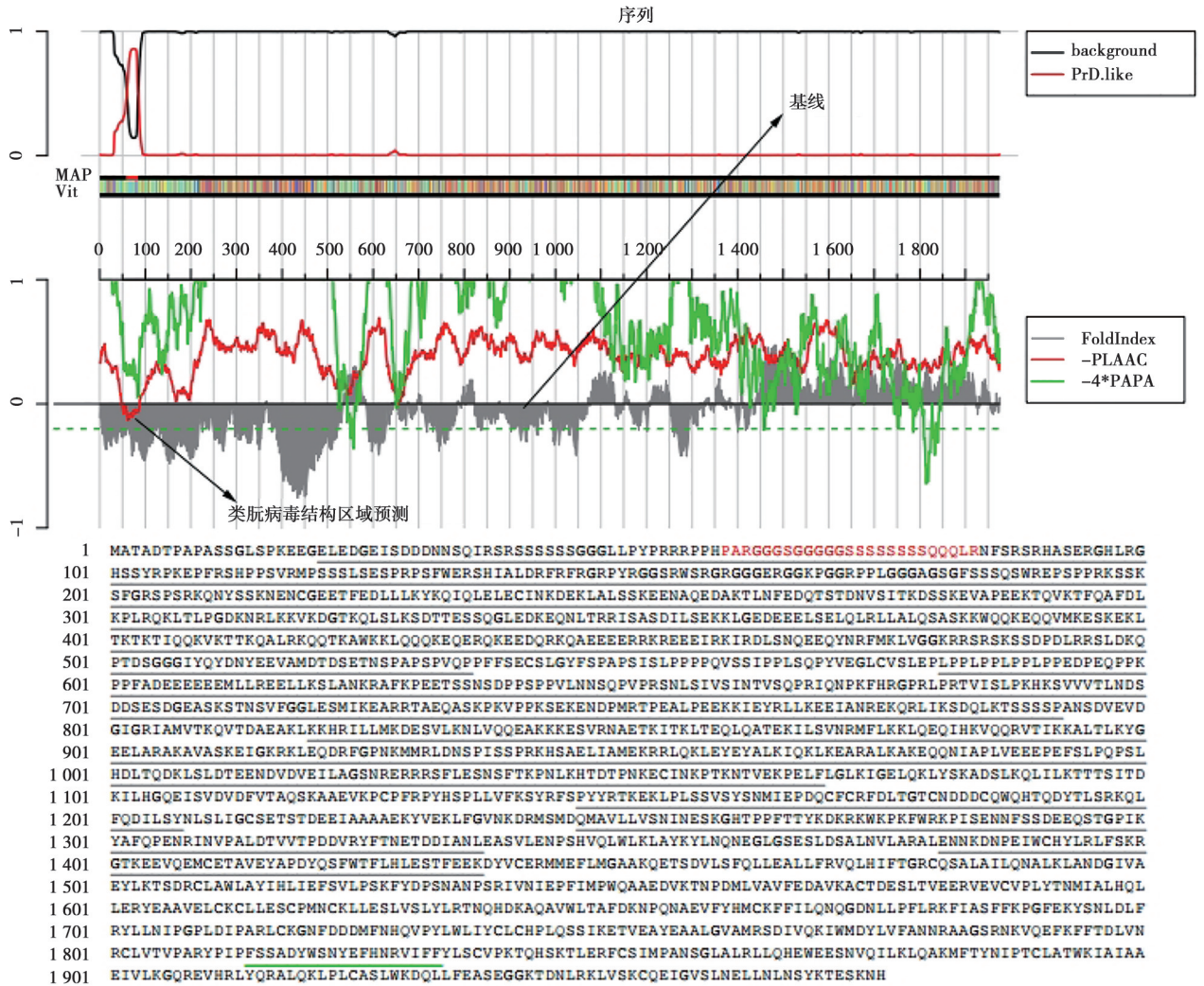


图 13 猪 ZFC3H1 蛋白类朊病毒结构区域预测

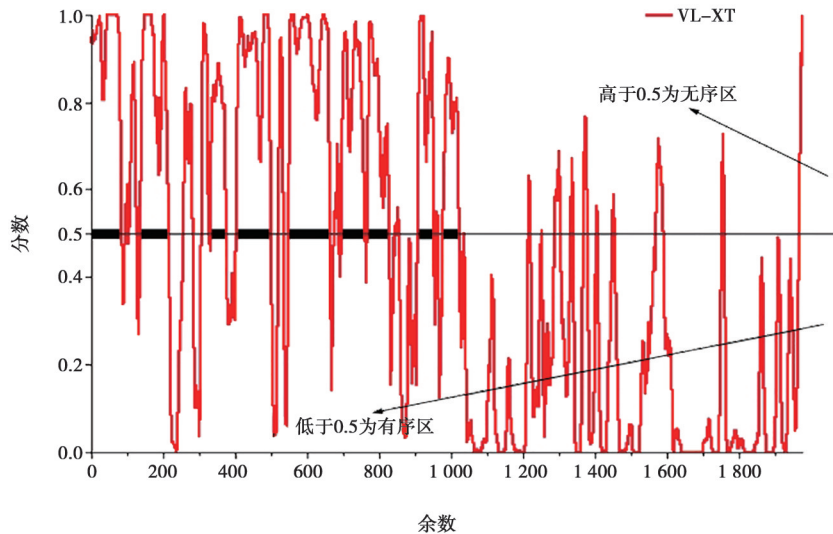


图 14 猪 ZFC3H1 蛋白 IDRs 区域预测

表 3 猪 ZFC3H1 基因与脂肪发育及产肉性状相关的 QTLs 分析

名称	GWAS 关联性状
BFT_L05-1、BFT_L05-2	13 周龄时的平均背膘厚度
BFT_L05-3、BFT_L05-4	17 周龄时的平均背膘厚度
BFT_L05-5	体重 40 kg 时的平均背膘厚度
BFT_L05-6、BFT_L05-7	体重 60 kg 时的平均背膘厚度
BW_L05-7	初生重
LMA_L05-1	眼肌面积
LMA_L05-1	胸锁长肌
MCOL_L05-12、MCOL_L05-1、 MCOL_L05-2、MCOL_L05-3、 TEXT_L05-1、MCOL_L05-7、 MCOL_L05-6、FACOM_L05-5、 FACOM_L05-6、PH_L05-3、JUI_L05-1	肉品质
总计	21 个 QTLs

表 4 猪 ZFC3H1 基因与数量遗传性状 QTLs 的关联分析

类别	有价值的 QTLs 数量
eQTLs	10
lncQTLs	218

### 3 讨论

LLPS 功能的发挥依赖于细胞中生物凝聚体的生成, 这些生物凝聚体因其固有的流动性、融合性和分散性的特点, 能够使细胞内的特定分子选择性地富集并形成相对独立的空间域, 从而在细胞内维持一定的“秩序”<sup>[25-26]</sup>。从分子机制来看, 发生 LLPS 的大分子存在一些普遍规律, 最常见的是蛋白质结构域中含有 IDRs, 这些 IDRs 通常富含极性带氨基酸, 缺乏疏水氨基酸, 使得其无法形成稳定的二级结构及三级结构<sup>[27]</sup>。IDRs 驱动相变主要归因于两个核心结构特征, 其一是不含有芳香族及脂肪族氨基酸且不能形成一个相对能量较低的、单一的折叠结构; 另一个特征是由低复杂度序列区 (low compositional complexity regions, LCR) 构成, 这些特性使 IDRs 在 LLPS 过程中具有独特的优势。因此, 为明确 ZFC3H1 基因的相分离潜力, 使用在线网站 PLAAC 与 PONDR 预测分析, 结果显示, ZFC3H1 存在有类朊病毒结构的蛋白序列和 9 个 IDRs 区域, 证实 ZFC3H1 具备介导 LLPS 的能力。此外, 根据上文预测可知, ZFC3H1 属于非分泌亲水蛋白, 这一属性与众多典型相分离驱动蛋白, 如融合蛋白 (fused in sarcoma, FUS), TAR DNA 结合蛋白 43 (TAR DNA-binding protein 43, TDP-43) 等高度一致。这类蛋白均以非分泌亲水特

性为基础, 通过分子间多价相互作用触发 LLPS, 进而动态调节细胞内各项生理活动。

在骨骼肌发育调控中, LLPS 的作用同样关键。例如, FUS 通过与 ETS 转录因子 5 (ets variant 5, ETV5) 和肌细胞增强因子 2A (myocyte enhancer factor 2A, MEF2A) 的相互作用, 在骨骼肌结构中影响着必需蛋白的功能, 同时 ETV5 水平的降低会进一步加剧肌无力的状况<sup>[28]</sup>。核糖体蛋白 S27a-like 蛋白 (ribosomal protein S27a-like1, Rps271) 通过其 N 末端固有无序区域驱动 LLPS, 与靶标胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 相互作用, 共同调节肌生成<sup>[29]</sup>。微小 RNA-214-3p (microRNA-214-3p, miR-214-3p) 和细胞型朊蛋白 (cellular prion protein, PrPC) 通过 LLPS 机制在骨骼肌细胞分化和肌纤维束形成过程中发挥着关键调控作用<sup>[30]</sup>。存在于肌萎缩侧索硬化症患者体内的两种蛋白质 TDP-43 和 FUS 可召集 RNA 分子形成凝聚体, 进而引发 LLPS<sup>[31]</sup>。此外, 在细胞增殖中发挥调控作用的 Hippo 通路因子 TAZ 及调控器官大小的 Wnt 信号通路 Dishevelled 关联蛋白 1 (dishevelled-associated protein 1, Dact1) 能分别通过 LLPS 效应抑制肌肉生成和影响小鼠和鸡的骨骼肌的细胞分化、细胞周期和细胞融合, 以及肌营养不良症<sup>[3,32]</sup>。MYOD 通过 LLPS 调控基因表达, 参与骨骼肌分化<sup>[33]</sup>。为探究 ZFC3H1 与猪脂肪及产肉性状间的关联性, 使用 ISwine 对其进行预测发现, ZFC3H1 存在 21 个猪相关脂肪发育及产肉性状的 QTLs, 根据 PigGTEx 对 ZFC3H1 与猪产肉性状相关 QTLs 的数量统计显示, 该基因含有 10 个有价值的 eQTLs, 并且该基因附近 218 个 lncQTLs, 大量有价值的 QTLs 区域与骨骼肌增殖密切相关。结合前文证实的 ZFC3H1 相分离潜力, 为后续探究其通过 LLP 调控骨骼肌发育进而影响猪产肉性能分子机制提供了方向。

ZFC3H1 是一种尚未定性的锌指蛋白, 也是一种南蛇藤毒素 A (celastramycin A) 结合蛋白。该蛋白有组成聚腺苷酸外切体靶向连接复合体 (polyA exosome targeting connection, PAXT), 维持 RNA 延伸和稳定, 参与外泌体降解的作用。同时, RNA 外泌体是真核细胞核内降解 RNA 的基础, 其辅助因子 MTREX 与 RNA 结合蛋白适配器相连, 有助于底物靶向。有研究发现, ZFC3H1 与 DNA 修复复合物中的 ERCC1 存在间接相互作用, 而锌指蛋白 ZFC3H3 可直接与 MTR4-ZFC3H1 相互作用, 且 PAXT 成分的缺失会引发底物积累。同时, 降低 RNA 解旋酶 Mtr4 或 ZFC3H1 的表达会导致转录后/未剪接 RNA 水平上升并在细胞质中积聚, 这一发现凸显出 Mtr4/ZFC3H1

在阻止天然不稳定 lncRNA 核内积累、向细胞质转运以及防止蛋白质合成受阻中的核心作用<sup>[34-36]</sup>。此外,该蛋白在细胞内独特的 IDRs 赋予其强大的多聚化能力。ZFC3H1 蛋白可通过形成核凝聚体阻止 RNA 进入核斑点,从而调控核 RNA 的出口,且其凝聚活性与 RNA 降解机制独立<sup>[37]</sup>。

本研究前期对杜洛克猪和藏香猪胫骨前肌进行泛素化蛋白组学测序(4D-label 泛素化测序),发现 ZFC3H1 的泛素化靶标结合位点在藏香猪中高于杜洛克猪。这些差异不仅凸显了 ZFC3H1 蛋白在调控骨骼肌发育中的关键作用,还揭示了泛素化作为调控因子可能在动物体型和肉质产量的分子机制中扮演着重要角色<sup>[38]</sup>。值得注意的是,作为纳米级的生物囊泡,外泌体对骨骼肌发育具有重要影响。它们不仅具备保护内部物质免受降解的能力,还能够在细胞通讯间安全地将信号转导传递给靶细胞,从而调节骨骼肌的正常发育过程。Mytidou 等<sup>[39]</sup>在研究骨骼肌组织中分泌 4 种肌肉特异性 microRNA (miR-1、miR-133a、miR-133b 和 miR-206) 的外泌体时发现,这些外泌体在相邻骨骼肌之间的通信中发挥着不同作用,并且在分泌体中的分布因肌肉纤维类型的不同而有所差异,当一种肌肉中的 miR-133a 和 miR-133b 下调时,会影响邻近肌肉和血液中外泌体的这些 microRNA 水平。Iyer 等<sup>[40]</sup>在研究胫骨前肌损伤的大鼠模型中发现,富含血小板的血浆衍生的外泌体能通过上调肌细胞生成素(MYOG)加速收缩功能的恢复节奏,并且血清外泌体还可对 T2DM 发挥调节作用。此外,蛋白质的翻译后修饰(PTM)对于生物 LLPS 同样非常重要,尤其是泛素化修饰可以驱动和影响相分离能力<sup>[41-42]</sup>。泛素化底物蛋白 ZFC3H1 具有降解外泌体的作用,因此可以合理推测外泌体携带的蛋白质等分子可能经过泛素化修饰引发 LLPS,进而影响其在靶细胞中的功能和生理作用,这一推测为外泌体研究提供了新的视角,值得进一步验证。

然而,由于骨骼肌发育涉及诸多分子间的互作,在对染色体伴随复合物的应用研究中发现,LLPS 并非驱动 CPC 的主要因素<sup>[43]</sup>。因此具有相分离能力的 ZFC3H1 在猪骨骼肌细胞中是否能够产生生物凝聚体并驱动 LLPS,进而影响肌细胞的增殖及肌肉沉积,有待深入探讨和更多佐证。

## 4 结论

本研究聚焦杜洛克猪和藏香猪差异性骨骼肌泛素化蛋白 ZFC3H1,生物信息学分析表明,ZFC3H1 蛋白质一级结构中富含较多的磷酸化位点,属于不稳定的非分泌蛋白(相较于稳定的分泌蛋白,这种蛋白

能够展现更强的相分离能力);对其二级结构观察发现,ZFC3H1 蛋白无序卷曲结构占据主导地位,与三级结构预测一致。进一步分析显示,ZFC3H1 作用因子具有类朊病毒结构的蛋白序列及 9 个 IDRs 区域,同时发现该基因部分片段与猪肉品质性状 QTLs 相关联,揭示其可能具有相分离潜力并在骨骼肌发育中扮演着重要角色。在不同品种(杜洛克猪和藏香猪)中 ZFC3H1 的表达量有差异,其表达受到泛素化降解的影响,这一发现为今后揭示肌肉发育的分子基础及治疗相关肌肉疾病提供了新的靶点。

## 参考文献:

- [1] LI X, LU L, TONG X, et al. Transcriptomic profiling of meat quality traits of skeletal muscles of the Chinese indigenous Huai pig and Duroc pig [J]. *Genes*, 2023, 14 (8): 1548.
- [2] ZHAO Y, LI J, LIU H, et al. Dynamic transcriptome profiles of skeletal muscle tissue across 11 developmental stages for both Tongcheng and Yorkshire pigs [J]. *BMC Genom*, 2015, 16 (1): 377.
- [3] LIU Y, FU Y, YANG Y, et al. Integration of multi-omics data reveals cis-regulatory variants that are associated with phenotypic differentiation of eastern from western pigs [J]. *Genet Sel Evol*, 2022, 54 (1): 62.
- [4] LI J, XIANG Y, ZHANG L, et al. Enhancer-promoter interaction maps provide insights into skeletal muscle-related traits in pig genome [J]. *BMC Biol*, 2022, 20 (1): 136.
- [5] 杨亚岚. 瘦肉型和脂肪型猪产肉性状差异及其后代杂种优势形成的调控机制研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [6] YANG Y, YAN J, FAN X, et al. The genome variation and developmental transcriptome maps reveal genetic differentiation of skeletal muscle in pigs [J]. *PLoS Genet*, 2021, 17 (11): e1009910.
- [7] HYMAN A A, WEBER C A, JÜLICHER F. Liquid-liquid phase separation in biology [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30: 39-58.
- [8] PENG P H, HSU K W, WU K J. Liquid-liquid phase separation (LLPS) in cellular physiology and tumor biology [J]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11 (8): 3766.
- [9] BRANGWYNNE C P, ECKMANN C R, COURSON D S, et al. Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation [J]. *Science*, 2009, 324 (5935): 1729-1732.
- [10] ALBERTI S, SAHA S, WOODRUFF J B, et al. A user's guide for phase separation assays with purified proteins [J]. *J Mol Biol*, 2018, 430 (23): 4806-4820.
- [11] TRIPATHI S, MIYAKE T, KELEBEEV J, et al. TAZ exhibits phase separation properties and interacts with Smad7 and  $\beta$ -catenin to repress skeletal myogenesis [J]. *J Cell Sci*, 2022, 135: jcs259097.
- [12] WANG R, CHEN F, CHEN Q, et al. MyoD is a 3D genome structure organizer for muscle cell identity [J]. *Nat Commun*, 2022, 13: 205.

- [13] The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46 (5): 2699.
- [14] ROMERO P, OBRADOVIC Z, DUNKER A K. Natively disordered proteins: functions and predictions [J]. *Appl Bioinformatics*, 2004, 3 (2/3): 105–113.
- [15] LINDING R, JENSEN L J, DIELLA F, et al. Protein disorder prediction: implications for structural proteomics [J]. *Structure*, 2003, 11 (11): 1453–1459.
- [16] LANCASTER A K, NUTTER-UPHAM A, LINDQUIST S, et al. PLAAC: a web and command-line application to identify proteins with prion-like amino acid composition [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30 (17): 2501–2502.
- [17] RIES R J, ZACCARA S, KLEIN P, et al. M<sup>6</sup>a enhances the phase separation potential of mRNA [J]. *Nature*, 2019, 571 (7765): 424–428.
- [18] TENG J, GAO Y, YIN H, et al. A compendium of genetic regulatory effects across pig tissues [J]. *Nat Genet*, 2024, 56 (1): 112–123.
- [19] FU Y, XU J, TANG Z, et al. A gene prioritization method based on a swine multi-omics knowledgebase and a deep learning model [J]. *Commun Biol*, 2020, 3 (1): 502.
- [20] ZHANG W, TAN X, LIN S, et al. CPLM 4.0: an updated database with rich annotations for protein lysine modifications [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50 (D1): D451–D459.
- [21] SAFRAN M, ROSEN N, TWIK M, et al. The GeneCards suite [M] // *Practical Guide to Life Science Databases*. Singapore: Springer Nature Singapore, 2021: 27–56.
- [22] UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47 (D1): D506–D515.
- [23] MARTIN F J, AMODE M R, ANEJA A, et al. Ensembl 2023 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51 (D1): D933–D941.
- [24] 李健, 刘亚星, 李超程, 等. 猪泛素化因子的筛选及生物信息学分析 [J]. *中国畜牧杂志*, 2024, 60 (5): 147–154.
- [25] KOTA D, PRASAD R, ZHOU H X. Adenosine triphosphate mediates phase separation of disordered basic proteins by bridging intermolecular interaction networks [J]. *J Am Chem Soc*, 2024, 146 (2): 1326–1336.
- [26] WANG F, ZHANG Y. Physiology and pharmacological targeting of phase separation [J]. *J Biomed Sci*, 2024, 31 (1): 11.
- [27] BORCHERDS W, BREMER A, BORGIA M B, et al. How do intrinsically disordered protein regions encode a driving force for liquid-liquid phase separation [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2021, 67: 41–50.
- [28] PICCHIARELLI G, WIENAND A, MEGAT S, et al. FUS controls muscle differentiation and structure through LLPS mediated recruitment of MEF2 and ETV5 [J]. *bioRxiv*, 2024. DOI: 2024.09.18.613669.
- [29] LIU X. Functions and regulatory mechanisms of ribosomal protein S27-like gene in skeletal muscle development [D]. Murdoch: Murdoch Univ, 2024.
- [30] TAO J, ZENG Y, DAI B, et al. Excess PrP (C) inhibits muscle cell differentiation via miRNA-enhanced liquid-liquid phase separation implicated in myopathy [J]. *Nat Commun*, 2023, 14 (1): 8131.
- [31] FAKIM H, VANDE VELDE C. The implications of physiological biomolecular condensates in amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2024, 156: 176–189.
- [32] CONTRICIANI R E, DA VEIGA F C, DO AMARAL M J, et al. Dact1 is expressed during chicken and mouse skeletal myogenesis and modulated in human muscle diseases [J]. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol*, 2021, 256: 110645.
- [33] 汪瑞婷. 骨骼肌特异转录调控因子 MyoD 通过相分离机制调控基因表达 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2019.
- [34] TOMITA T, IEGUCHI K, COIN F, et al. ZFC3H1, a zinc finger protein, modulates IL-8 transcription by binding with celestramycin A, a potential immune suppressor [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (9): e108957.
- [35] SILLA T, KARADOULAMA E, MAKOSA D, et al. The RNA exosome adaptor ZFC3H1 functionally competes with nuclear export activity to retain target transcripts [J]. *Cell Rep*, 2018, 23 (7): 2199–2210.
- [36] OGAMI K, RICHARD P, CHEN Y, et al. An Mtr4/ZFC3H1 complex facilitates turnover of unstable nuclear RNAs to prevent their cytoplasmic transport and global translational repression [J]. *Genes Dev*, 2017, 31 (12): 1257–1271.
- [37] WANG Y, FAN J, WANG J, et al. ZFC3H1 prevents RNA trafficking into nuclear speckles through condensation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49 (18): 10630–10643.
- [38] LI M, LI C, CHEN X, et al. Differential analysis of ubiquitin-proteomics in skeletal muscle of Duroc pigs and Tibetan fragrant pigs [J]. *Front Vet Sci*, 2024, 11: 1455338.
- [39] MYTIDOU C, KOUTSOULIDOU A, KATSILOUDI A, et al. Muscle-derived exosomes encapsulate myomiRs and are involved in local skeletal muscle tissue communication [J]. *FASEB J*, 2021, 35 (2): e21279.
- [40] IYER S R, SCHEIBER A L, YAROWSKY P, et al. Exosomes isolated from platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells promote recovery of function after muscle injury [J]. *Am J Sports Med*, 2020, 48 (9): 2277–2286.
- [41] DU M, EA C K, FANG Y, et al. Liquid phase separation of NEMO induced by polyubiquitin chains activates NF- $\kappa$ B [J]. *Mol Cell*, 2022, 82 (13): 2415–2426.
- [42] CHOU M C, WANG Y H, CHEN F Y, et al. PAICS ubiquitination recruits UBAP2 to trigger phase separation for purinosome assembly [J]. *Mol Cell*, 2023, 83 (22): 4123–4140.
- [43] HEDTFELD M, DAMMERS A, KOERNER C, et al. A validation strategy to assess the role of phase separation as a determinant of macromolecular localization [J]. *Mol Cell*, 2024, 84 (9): 1783–1801.