

# 内核膜相关的蛋白质降解(INMAD)的研究进展

张雨恬 臧奕\*

(中国科学院上海药物研究所, 国家新药筛选中心, 上海 201203)

**摘要** 在真核生物中,核膜由双层磷脂分子层组成,这是真核生物区别于原核生物的一大特征。外核膜与内质网相连,内核膜上则有许多特异的蛋白,核孔复合体横跨分隔着内外核膜。内核膜相关的蛋白质降解(INMAD),主要通过泛素蛋白酶体途径,介导错误折叠或错误定位到核内的蛋白的降解,或调控核膜蛋白的分布,是近年来发现的核内蛋白质量控制新领域。INMAD与内质网相关的蛋白质降解(ERAD)有许多相同之处,ERAD的研究较多,但INMAD的机制仍有很多空白。该文总结了三种泛素连接酶介导的INMAD: Asil1/3、Doa10、APC/C。三者在经典底物、底物识别和泛素化降解过程有所不同。同时该文讨论了INMAD在维持内核膜平衡中的作用,随着INMAD研究的不断深入,可能为内核膜相关疾病的发现与修复提供策略。

**关键词** 核膜; 内核膜; 内核膜相关的蛋白质降解; 泛素蛋白酶体; 泛素连接酶; 芽殖酵母

## Research Advances of Inner Nuclear Membrane-Associated Degradation

ZHANG Yutian, ZANG Yi\*

(The National Center for Drug Screening, Shanghai Institute of Material Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

**Abstract** In eukaryotes, nuclear envelope is composed of two lipid bilayers, which distinguishes eukaryotes from prokaryotes. ONM (outer nuclear membrane) is continuous with endoplasmic reticulum. INM (inner nuclear membrane) is a specialized compartment with a unique proteome. ONM and INM are separated by nuclear pore complex. Recently, INMAD (inner nuclear membrane-associated degradation) has come into sight as a new pathway for protein quality control in nucleus. Ubiquitin-proteasome system is the most common mechanism for INMAD. INMAD not only degrades misfolded or mislocalized protein in nucleus, but also affects the distribution of INM protein. Current knowledge indicates that INMAD has some similarities to ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation). The mechanism of ERAD has been extensively studied, while INMAD pathway remains to be further elucidated. Herein, three branches of INMAD mediated by three E3 ubiquitin ligases were discussed, including Asil1/3, Doa10 and APC/C. They are different in canonical substrates, substrate recognition signals and the subsequent processes of ubiquitination and degradation. Furthermore, INMAD is important in INM homeostasis. With the further study of INMAD, it may provide new strategies for discoveries and treatments of INM-related diseases.

**Keywords** nuclear envelope; inner nuclear membrane; INMAD; ubiquitin-proteasome system; E3 ubiquitin ligases; budding yeast

双层核膜的出现标志着真核生物的诞生,推动了生物从简单向复杂的进化。完整的核膜包括外

核膜(outer nuclear membrane, ONM)、内核膜(inner nuclear membrane, INM)、核孔复合体(nuclear pore

收稿日期: 2020-02-16 接受日期: 2020-05-07

上海市科委项目(批准号: 19JC1416300)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-50800753-124, E-mail: yzang@simmm.ac.cn

Received: February 16, 2020 Accepted: May 7, 2020

This work was supported by Shanghai Committee of Science and Technology, China (Grant No.19JC1416300)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-50800753-124, E-mail: yzang@simmm.ac.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5315>

complex, NPC)<sup>[1]</sup>。外核膜与内质网相连,部分功能相通。核孔复合体横跨核膜,是核内外物质交换的渠道。内核膜上则有很多特异的蛋白,内核膜蛋白通过扩散、Ran-GTPase依赖的转运等方式,经核孔复合体进入核内侧,与其他核膜蛋白、核纤肽或染色体相互作用而驻留在核内<sup>[2-3]</sup>,参与细胞质与核的骨架连接、转录因子招募、DNA损伤修复、染色体定位与移动等活动<sup>[4]</sup>。细胞核是储存生物信息的宝库,维系着细胞及个体的正常生命活动,但核内的许多过程对科学家来说仍然是一个谜。

蛋白质质量控制(protein quality control, PQC)主要针对异常蛋白,通过鉴别、分拣、修复和降解等过程,避免细胞受损<sup>[5-6]</sup>。细胞内有两种蛋白降解途径:泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)和自噬溶酶体通路(autophagy-lysosome pathway, ALP)<sup>[7]</sup>。其中,泛素-蛋白酶体介导了80%以上的降解,主要过程是泛素分子共价结合在底物上,促使底物被蛋白酶体26S识别而降解。底物的泛素化通常需要三种酶的参与——泛素激活酶(ubiquitin-activating enzyme, E1)催化泛素分子,泛素结合酶(ubiquitin-conjugating enzyme, E2)结合活化的泛素,泛素连接酶(ubiquitin ligase, E3)介导泛素对底物侧链的修饰<sup>[8]</sup>。E3酶是一类具有HECT(homologous to E6-AP carboxyl terminus)或RING(really interesting new gene)结构域的蛋白家族,是精确开启降解的关键。E3酶通过多种机制实现对特定底物的识别——直接识别底物的特殊序列或翻译后修饰,间接通过辅助因子与底物识别,或E3酶自身被修饰后识别底物等<sup>[9]</sup>。

细胞核这样独特的区域,是否也存在蛋白质质量控制呢?这种过程对细胞的稳态、生物个体的健康,又有何意义?本文将综述内核膜相关的蛋白质降解(inner nuclear membrane-associated degradation, INMAD)的研究进展,从研究较多的内质网相关的蛋白质降解(endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD)出发,围绕INMAD的三种E3酶,讨论目前INMAD研究的局限,展望未来研究的方向,以期为推进内核膜蛋白领域的新发现,及其与疾病的新联系提供思路。

## 1 内质网相关的蛋白质降解(ERAD)

内质网承担着蛋白质合成与初步加工的重要

功能,也担负了对错误折叠蛋白进行处理的责任,即ERAD。ERAD包括“底物的识别、底物从内质网向细胞质的逆转位(retrotranslocation)、底物的降解”三个步骤<sup>[10]</sup>。目前,在芽殖酵母中鉴定到两种内质网上的E3酶(Doa10和Hrd1),它们主导了几乎所有ERAD底物的识别。Doa10一般与E2酶Ubc6/Ubc7(Cue1)配合泛素化底物<sup>[11]</sup>,Hrd1则与E2酶Ubc1/Ubc7(Cue1)合作<sup>[12]</sup>。泛素化底物最终被细胞质中的蛋白酶体降解,需要一定的机制把底物从内质网逆向转运回细胞质中,即逆转位。这依赖于ATPase Cdc48和Ufd1/Npl4组成的易位子(translocon)——在需要时易位子被招募至内质网,使泛素化底物解折叠后,传递至胞质中<sup>[13]</sup>。

## 2 内核膜相关的蛋白质降解(INMAD)

酵母作为较简单的单细胞真核生物,是研究真核细胞生命活动的常用模式生物。对INMAD的认识也是从芽殖酵母中E3酶的发现开始的。

2006年,科研人员发现,ERAD经典的E3酶Doa10也定位在内核膜上,介导了转录因子Mata2(homeodomain mating type protein alpha2)的降解<sup>[14]</sup>。同年,研究发现,内核膜上还存在着一种特有的E3酶——Asi1/3,对核内的Stp1/2进行降解<sup>[15]</sup>。近期,核内游离的E3酶——细胞分裂后期促进复合物(anaphase-promoting complex/cyclosome, APC/C)被发现参与内核膜蛋白Mps3的降解<sup>[16]</sup>。这三种E3酶介导的降解被定义为内核膜相关的蛋白质降解<sup>[17]</sup>,根据与内核膜的相关性分为两类:E3酶是内核膜蛋白(Asi1/3、Doa10介导的INMAD),或底物是内核膜蛋白(APC/C介导的INMAD)。因为Cdc48-Ufd1/Npl4易位子和蛋白酶体26S同时存在于细胞质与核内<sup>[18]</sup>,而E2酶Ubc6和Ubc7(Cue1)也有内核膜的定位,因此,INMAD与ERAD的部分保守元件可能是共通的(图1和图2)。

下面我们根据E3酶的不同将INMAD分为三个分支(Asi复合物、Doa10和APC/C)展开综述。

### 2.1 Asi复合物与INMAD

酵母感应胞外充足的氨基酸,通过SPS(Ssy1-Ptr3-Ssy5)信号通路,使转录因子Stp1/2的N-端被切割,入核开启大量氨基酸通透酶、代谢酶的表达,以便酵母充分地利用氨基酸<sup>[19]</sup>。2001年,FORSBERG等<sup>[20]</sup>设计实验,在SPS突变致死的酵母株中,再进行随机突变,发现了一系列新基因能使酵母株继续存活,这些基因被称为ASI(amino acid sensor-independent)。随

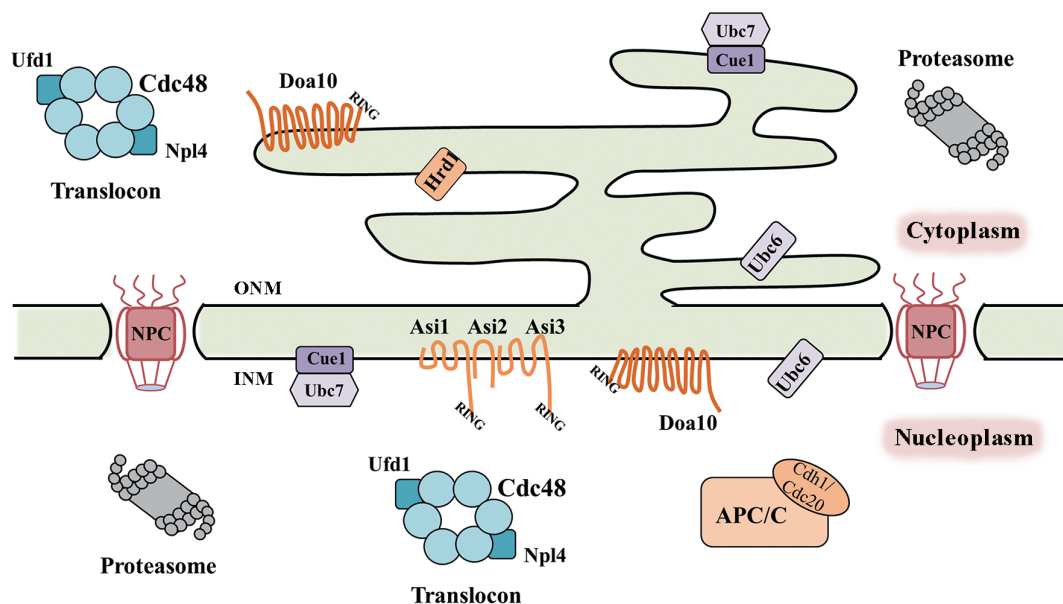


图1 ERAD和INMAD的重要保守元件示意图(根据参考文献[17]改编)

Fig.1 Schematic representation of crucial elements in ERAD and INMAD (modified from reference [17])

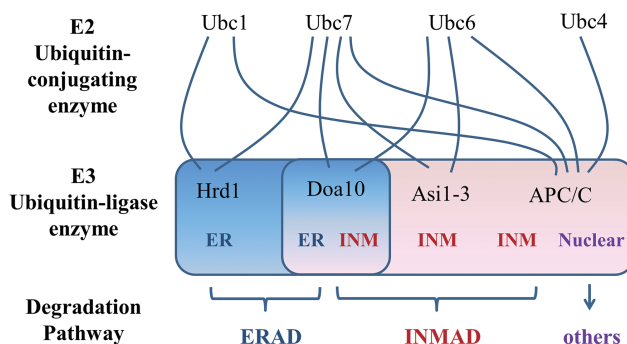


图2 ERAD和INMAD中关键E2、E3酶的比较(根据参考文献[17]改编)

Fig.2 Comparison of E2, E3 enzymes in ERAD and INMAD (modified from reference [17])

后, 同实验室的研究者们陆续报道发现, 全长和切割后的Stp1/2都能发挥转录调控作用, 但Asi1、Asi2和Asi3组成的复合物, 在核内会识别并降解全长的Stp1/2, 因此, 只有SPS通路中被切割的Stp1/2才能调控转录。当Asi复合物缺失时, 全长的Stp1/2也能在核内积累, 不依赖于SPS通路而调控转录<sup>[15,21]</sup>, 使酵母存活。

Asi1和Asi3是五次跨膜的内核膜蛋白, 面向核内的C-端有RING结构域, 具有E3泛素连接酶的活性。两次跨膜的Asi2虽然没有E3酶活性, 但单独缺失Asi2也会使全长的Stp1/2在核内无法被降解<sup>[20]</sup>。2014年, FORESTI等<sup>[22]</sup>发现, Asi2的缺失虽然不影响Asi1/3形成异源二聚体, 但会影响底物Erg11的降解。同年, KHMELINSKII等<sup>[23]</sup>又发现, Asi2并非对所有

底物的降解都是必要的。2020年, NATARAJAN<sup>[24]</sup>的最新研究发现, Asi2与底物跨膜区域结合后, 才能启动Asi复合物的泛素化, 这表明Asi2可能对某些特定底物的泛素化启动是必要的。

FORESTI<sup>[22]</sup>和KHMELINSKII实验室<sup>[23]</sup>分别利用SILAC定量蛋白质谱技术和tFTr(tandem fluorescent protein time)<sup>[25]</sup>实验鉴定到了许多Asi复合物的新底物(表1)。FORESTI主要发现了底物甾醇合成酶Erg11和Nsg1。一般我们认为, 内质网是发生脂质合成的主要场所, 所以FORESTI认为Erg11和Nsg1可能是因此被错误定位到内核膜上的, 进而触发了降解。2018年最新报道发现, 内核膜也有脂质合成的功能<sup>[26]</sup>, 这提示Erg11和Nsg1可能本身就存在于内核膜上, 发生降解的原因并非错误定位。KHMELINSKII利用tFT技

表1 已知Asi1/3、Doa10、APC/C的INMAD底物

Table 1 The substrates of Asi1/3, Doa10 and APC/C in INMAD

泛素连接酶 E3	底物类型 Type of substrate	底物 Substrate	泛素结合酶 E2	Cdc48介导逆转位 Cdc48 mediated retrotranslocation	底物的识别 Substrate recognition	泛素化效应 Effect of ubiquitination	参考文献 Reference
Asi1/3	Transcription factor	Stp1/2 (full-length)	Predicated: Ubc7 (Cue1) Ubc6	No	Stp1 (aa 2-69) Stp2 (aa 2-77)	Degradation	[15] [20] [21]
				Yes	Unknown	Degradation	[22]
				Yes	Unknown	Degradation	[22]
	/	20 potential substrates (Vtc1, Vcx1, Vtc4, et al)	/	/	Degradation	[23]	
	NPC-localized protein	Pom33 Tst1 TMEM33	Ubc7 (Cue1)	/	Unknown	Distribution	[41]
Doa10	Transcription repressor	Mata2	Ubc7 (Cue1) Ubc6	No	Deg1 region (67 residues in N-terminal)	Degradation	[14] [27]
	Kinetochores protein	Ndc10-2 (mutant)		No	Predicted: amphipathic helix	Degradation	[28]
	Spindle pole body	Mps2-1 (mutant)		Yes	/	Degradation	[28]
	E3 ligase	Asi2		Yes	/	Degradation	[29]
APC/C in INM	SUN-domain protein	Mps3	Ubc7 (Cue1) Ubc6	Yes	KEN-box, D-box S70 phosphorylation in N-terminal	Degradation	[16]

“/”表示无详细报道。

“/” represents unclear.

术筛选到了20个潜在底物,这些底物在Asi1/3突变后半衰期增加,并且出现了内核膜聚集现象,包括已报道的Erg11,以及空泡蛋白Vcx1、Vtc1、Vtc4和其他膜蛋白。

那么Asi复合物是如何发挥作用的呢? FOREST<sup>[22]</sup>的研究发现,Asi1/3和E2酶Ubc6、Ubc7(Cue1)有相互作用,在Erg11、Nsg1的降解中以Ubc7(Cue1)为主。除了Stp1/2外,目前还没有发现Asi复合物的其他底物有相似的序列(即降解决定子),所以Asi复合物究竟如何实现特定底物的识别,还有待研究。

## 2.2 Doa10与INMAD

2001年,SWANSON等<sup>[27]</sup>发现,Doa10可以泛素化核内的转录因子Mata2。Doa10作为ERAD经典的E3酶已有不少研究。那内质网蛋白和核内蛋白是如何产生交集的呢? 2006年,DENG等<sup>[14]</sup>在内核膜上也发现了Doa10,可以解释Doa10对Mata2的泛素化作用。但另一个ERAD的经典E3酶——Hrd1没有在内核膜上被发现,Doa10也没有特殊的入核信号肽,所以内质

网是如何选择Doa10进入核内的还有待研究。

Doa10在核内的经典底物除了Mata2外,还有其他的蛋白,例如突变的着丝粒组分Ndc10-2,突变的内核膜蛋白Mps2-1<sup>[28]</sup>和Asi2<sup>[29]</sup>(表1)。以上底物在被Doa10泛素化时,与ERAD一样,也需要驻留在内核膜上的E2酶Ubc6和Ubc7(Cue1)来呈递泛素。

Doa10在ERAD中的底物一般有富含两亲性螺旋结构的降解决定子Deg1或CL<sup>[14]</sup>。在INMAD中,Doa10对底物的识别是否也遵循一样的机制呢? 底物的不断发现,给了我们线索——Mata2的前67个氨基酸就是Deg1序列, N-端发生乙酰化和蛋氨酸去除的修饰后<sup>[30]</sup>,介导了Doa10对Mata2的识别; Ndc10-2、Mps2-1具有的两亲性区段能形成螺旋结构,若突变蛋白错误折叠,就可能被Doa10识别;而Asi2的49~66位氨基酸被预测也能形成两亲性的螺旋结构。

## 2.3 APC/C和INMAD

APC/C是游离在核内,由多个亚基组成的E3酶<sup>[31]</sup>。

APC/C在细胞周期调控中具有重要的地位, 可以通过对细胞周期相关蛋白的泛素化降解, 从而精确地调控细胞周期的转换<sup>[32-33]</sup>, 并受共激活分子细胞周期蛋白20(cell division cycle 20, Cdc20)及其同源物1(CDC20-homologue 1, Cdh1)调控<sup>[34-35]</sup>。

近期KOCH等<sup>[16]</sup>发现, APC/C参与了芽殖酵母内核膜蛋白Mps3的泛素化降解, 因此, 把它归为INMAD的一种途径。Mps3作为人源SUN结构域蛋白1(SAD1/UNC84 domain containing protein, SUN1)的同源物, 是细胞质骨架和核内骨架连接复合物(linker of nucleoskeleton to cytoskeleton, LINC)的重要组分<sup>[36]</sup>, 在纺锤体分离和正确的细胞周期进展中也非常重要<sup>[37]</sup>。虽然有研究在体外实验中筛选到和APC/C相互作用的E2酶是Ubc1和Ubc4<sup>[33]</sup>, 但在Mps3的泛素化过程中, APC/C主要与Ubc7(Cue1)和Ubc6作用。由于Mps3是跨膜蛋白, KOCH<sup>[16]</sup>猜测它的降解也需要经历Cdc48-Ufd1/Npl4易位子介导的逆转位过程。实验中阻断这个步骤, 确实能增加Mps3的半衰期。

APC/C不同于Asi和Doa10, 它是游离在核内的蛋白复合物, 必须被招募到核周, 才能发挥其对Mps3甚至更多内核膜蛋白的识别和泛素化作用。分析发现, Mps3的N-端包含了70位丝氨酸的磷酸化位点和两个特殊序列(D-box和KEN-box)。底物磷酸化和泛素化间的相互关系, 在APC/C的经典底物中已有很多讨论<sup>[38]</sup>, 因此, Mps3磷酸化修饰的作用很可能是APC/C被内核膜招募的触发条件。而把D-box和KEN-box融合到原本稳定的内核膜蛋白Heh2上, Heh2马上被降解了。由此推测, 这两个序列是APC/C识别底物的降解决定子。

### 3 INMAD的重要性——内核膜平衡与相关疾病

内核膜的稳态平衡, 对维持细胞机体正常运行非常重要。当内核膜蛋白的突变或异常聚集无法被有效清除时, 会产生不良的后果。芽殖酵母的内核膜蛋白Mps3过度聚集, 会造成核膜扩张, 损伤正常的细胞周期进程<sup>[36,39]</sup>, 而Mps3的哺乳动物同源物SUN1的异常累积则是诱发早衰和核纤层疾病的病因<sup>[40]</sup>。E3酶APC/C是调控Mps3降解的关键元件, 但APC/C在SUN1相关疾病中是否起了关键作用, 尚未见研究报道。近期SMOYER等<sup>[41]</sup>研究发现, 敲除

*Asi1*后, 除了已知的底物在核内的半衰期增加外, 保守的核孔蛋白Pom33/Tts1/TMEM33的分布也出现了异常。这些蛋白的异常, 直接影响了核孔复合体的分布、稳定性及转运功能。这提示我们, *Asi1*介导的蛋白泛素化不仅可以清除异常蛋白, 还控制着核膜蛋白的正确分布。

虽然INMAD在哺乳动物内核膜平衡中的作用尚未有报道, 但我们推测, INMAD对哺乳动物细胞尤其是停止分裂的细胞同样有着重要的作用。例如, 神经元无法通过不对称分裂等方法, 来清除异常的蛋白, 所以拥有更为精细的蛋白质量控制系统以便及时处理这些“垃圾”, 方能维持正常功能。泛素蛋白酶体通路受抑制而导致蛋白异常聚集, 是不少神经退行性疾病的特点<sup>[42]</sup>。分裂过程中核膜的解体, 使胞质中的降解通路可能作用于核内蛋白。若在无法分裂的细胞中, 核内蛋白质量控制又受损, 可能造成不可逆转的损伤。因此, 我们猜测INMAD作为核内的蛋白质量控制系统, 可能对停止分裂的细胞具有更重要的意义。

INMAD的研究可能为核功能失调疾病的发现<sup>[43-45]</sup>、修复和逆转提供新的策略。虽然目前, INMAD的进展距离应用还很远, 但正如泛素蛋白酶体系统发现之初, 科学家们也不曾想到, 靶向泛素蛋白酶体系统如今会被应用于多种疾病的治疗<sup>[46]</sup>: 蛋白降解靶向嵌合体(proteolysis targeting chimera, PROTAC)技术有将无法成药的蛋白质作为靶蛋白的潜力, 以及可能在药物耐药中发挥作用的潜力, 近年来赢得了广泛关注; 蛋白酶体抑制剂硼替佐米成功用于治疗多发性骨髓瘤、细胞淋巴瘤等癌症; 其他靶向泛素-蛋白酶体通路不同组分药物在研, 如泛素连接酶抑制剂Nutlin-3、去泛素化酶抑制剂等。INMAD的研究目前处在初期阶段, 而更多INMAD中E3酶以及其底物特异性识别的机制的发现, 可能是INMAD从基础研究走向应用的关键。

### 4 结语和展望

尽管APC/C、Doa10等E3酶被发现多年, 近年来科学家们才把它们与INMAD联系起来进行研究。INMAD领域还有很多问题有待探索, 但也有些线索。

(1)哺乳动物中INMAD的研究有空缺。目前, INMAD的大部分研究都是从芽殖酵母出发的, 其中

一些蛋白在芽殖酵母和哺乳动物中较为保守<sup>[17]</sup>。E3酶Doa10和APC/C有哺乳动物的同源物,芽殖酵母的Mps3与哺乳动物的SUN1也有着高度的保守性。可见哺乳动物的SUN1,可能也受类似的INMAD机制调控。但在哺乳动物中没有发现Asi复合物的同源物,可能Asi1/3是芽殖酵母中特有的E3酶<sup>[47]</sup>。科学家们发现哺乳动物的ERAD中,除了芽殖酵母Doa10和Hrd1的同源物外,还存在其他E3酶,例如Rfp2、TRC8、TMEM129、RNF145、RNF170和RNF185<sup>[48-53]</sup>。我们推测,除了Doa10和APC/C的同源物外,进化更高级的哺乳动物中有更多尚未被发现的INMAD泛素连接酶。

(2)INMAD如何选择并特异识别底物。目前发现的INMAD底物,大多是错误折叠或错误定位的内核膜/核内蛋白,又或是其表达需要被周期调控的核蛋白。INMAD的E3酶如何识别底物,有部分研究报道。例如,Doa10通过富含两亲性螺旋结构的降解决定子来识别底物,APC/C则识别D-box、KEN-box和底物的磷酸化,但Asi1/3的大部分底物都没有找到相似的结构区域(降解决定子)。INMAD的E3酶识别并精准地选择需要被降解的底物的具体机制,还需要更多的实验证明。

(3)INMAD的研究可以借鉴ERAD。INMAD与ERAD类似,都是依赖于膜结构发生的蛋白质降解过程。在INMAD过程中,内核膜上的底物是如何从膜中暴露出来,从而被核内的蛋白酶体降解呢?前文我们介绍了ERAD的逆转位主要由Cdc48-Ufd1/Npl4易位子介导。KOCH等<sup>[16]</sup>研究发现,APC/C的底物Mps3的降解,也依赖于Cdc48-Ufd1/Npl4发生逆转位。此外,Asi复合物的底物Erg11、Nsg1和Doa10的底物Mps2、Asi2这类跨膜蛋白的降解,也有Cdc48-Ufd1/Npl4的参与。我们推测逆转位元件的共享,是由于E2酶Ubc7(Cue1)、Ubc6的相通。借鉴ERAD的机制,可以给INMAD新底物发现、底物识别、泛素化和逆转位的研究提供线索。

INMAD是一个充满未知和潜力的新兴领域,但目前国内对该领域关注度不高。希望通过本文的综述,能引起更多中国的科研工作者对INMAD的关注,进而做出有国际影响力的成果。

### 参考文献 (References)

[1] SCHIRMER E C, GERACE L. The nuclear membrane proteome:

- extending the envelope [J]. *Trends Biochem Sci*, 2005, 30(10): 551-8.
- [2] KATTA S S, SMOYER C J, JASPERSEN S L. Destination: inner nuclear membrane [J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(4): 221-9.
- [3] BURNS L T, WENTE S R. Trafficking to uncharted territory of the nuclear envelope [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2012, 24(3): 341-9.
- [4] HOLMER L, WORMAN H J. Inner nuclear membrane proteins: functions and targeting [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58(12/13): 1741-7.
- [5] WOLFF S, WEISSMAN J S, DILLIN A. Differential scales of protein quality control [J]. *Cell*, 2014, 157(1): 52-64.
- [6] DUBNIKOV T, BEN-GEDALYA T, COHEN E. Protein quality control in health and disease [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, 9(3): a023523.
- [7] POHL C, DIKIC L. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy [J]. *Science*, 2019, 366(6467): 818-22.
- [8] HOCHSTRASSER M. Ubiquitin-dependent protein degradation [J]. *Annu Rev Genet*, 1996, 30(4): 405-39.
- [9] LI W, BENGTON M H, ULBRICH A, et al. Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling [J]. *PLoS One*, 2008, 3(1): e1487.
- [10] MEHRTASH A B, HOCHSTRASSER M. Ubiquitin-dependent protein degradation at the endoplasmic reticulum and nuclear envelope [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 93: 111-24.
- [11] RAVID T, KREFT S G, HOCHSTRASSER M. Membrane and soluble substrates of the Doa10 ubiquitin ligase are degraded by distinct pathways [J]. *EMBO J*, 2006, 25(3): 533-43.
- [12] BAYS N W, GARDNER R G, SEELIG L P, et al. Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(1): 24-9.
- [13] BODNAR N O, RAPOPORT T A. Molecular mechanism of substrate processing by the cdc48 ATPase complex [J]. *Cell*, 2017, 169(4): 722-35.e9.
- [14] DENG M, HOCHSTRASSER M. Spatially regulated ubiquitin ligation by an ER/nuclear membrane ligase [J]. *Nature*, 2006, 443(7113): 827-31.
- [15] BOBAN M, ZARGARI A, ANDRÉASSON C, et al. Asi1 is an inner nuclear membrane protein that restricts promoter access of two latent transcription factors [J]. *J Cell Biol*, 2006, 173(5): 695-707.
- [16] KOCH B A, JIN H, TOMKO R J, et al. The anaphase-promoting complex regulates the degradation of the inner nuclear membrane protein Mps3 [J]. *J Cell Biol*, 2019, 218(3): 839-54.
- [17] KOCH B, YU H G. Regulation of inner nuclear membrane associated protein degradation [J]. *Nucleus*, 2019, 10(1): 169-80.
- [18] WÓJCIK C, DEMARTINO G N. Intracellular localization of proteasomes [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35(5): 579-89.
- [19] ANDRÉASSON C, LJUNGDAHL P O. Receptor-mediated endoproteolytic activation of two transcription factors in yeast [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(24): 3158-72.
- [20] FORSBERG H, HAMMAR M, ANDRÉASSON C, et al. Suppressors of *ssy1* and *ptr3* null mutations define novel amino acid sensor-independent genes in *saccharomyces cerevisiae* [J]. *Genetics*, 2001, 158(3): 973-88.

- [21] ZARGARI A, BOBAN M, HEESSEN S, et al. Inner nuclear membrane proteins Asi1, Asi2, and Asi3 function in concert to maintain the latent properties of transcription factors Stp1 and Stp2 [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(1): 594-605.
- [22] FORESTI O, RODRIGUEZ-VAELLO V, FUNAYA C, et al. Quality control of inner nuclear membrane proteins by the Asi complex [J]. *Science*, 2014, 346(6210): 751-5.
- [23] KHMELINSKII A, BLASZCZAK E, PANTAZOPOULOU M, et al. Protein quality control at the inner nuclear membrane [J]. *Nature*, 2014, 516(7531): 410-3.
- [24] NATARAJAN N, FORESTI O, WENDRICH K, et al. Quality control of protein complex assembly by a transmembrane recognition factor [J]. *Mol Cell*, 2020, 77(1): 108-19.e9.
- [25] KHMELINSKII A, KELLER PJ, BARTOSIK A, et al. Tandem fluorescent protein timers for *in vivo* analysis of protein dynamics [J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(7): 708-14.
- [26] ROMANAUSKA A, KÖHLER A. The inner nuclear membrane is a metabolically active territory that generates nuclear lipid droplets [J]. *Cell*, 2018, 174(3): 700-15.e18.
- [27] SWANSON R, LOCHER M, HOCHSTRASSER M. A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha 2 repressor degradation [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(20): 2660-74.
- [28] RAVID T, KREFT SG, HOCHSTRASSER M. Membrane and soluble substrates of the Doa10 ubiquitin ligase are degraded by distinct pathways [J]. *EMBO J*, 2006, 25(3): 533-43.
- [29] BOBAN M, PANTAZOPOULOU M, SCHICK A, et al. A nuclear ubiquitin-proteasome pathway targets the inner nuclear membrane protein Asi2 for degradation [J]. *J Cell Sci*, 2014, 127(Pt16): 3603-13.
- [30] HWANG C S, SHEMORRY A, VARSHAVSKY A. N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals [J]. *Science*, 2010, 327(5968): 973-7.
- [31] KING R W, PETERS J M, TUGENDREICH S, et al. A 20s complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B [J]. *Cell*, 1995, 81(2): 279-88.
- [32] IRNIGER S, PIATTI S, MICHAELIS C, et al. Genes involved in sister chromatid separation are needed for b-type cyclin proteolysis in budding yeast [J]. *Cell*, 1995, 81(2): 269-78.
- [33] SUDAKIN V, GANOTH D, DAHAN A, et al. The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis [J]. *Mol Biol Cell*, 1995, 6(2): 185-97.
- [34] VISINTIN R, PRINZ S, AMON A. CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis [J]. *Science*, 1997, 278(5337): 460-3.
- [35] PFLEGER C M, KIRSCHNER M W. The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1 [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(6): 655-65.
- [36] JASPERSEN S L, GIDDINGS T H, WINEY M. Mps3p is a novel component of the yeast spindle pole body that interacts with the yeast centrin homologue Cdc31p [J]. *J Cell Biol*, 2002, 159(6): 945-56.
- [37] LI P, JIN H, KOCH B A, et al. Cleavage of the SUN-domain protein Mps3 at its N-terminus regulates centrosome disjunction in budding yeast meiosis [J]. *PLoS Genet*, 2017, 13(6): e1006830.
- [38] 付航玮, 钟浩, 陈平. 泛素连接酶APC/C参与的泛素化与细胞周期调节[J]. *中国生物化学与分子生物报(FU H W, ZHONG H, CHEN P. Ubiquitin ligase APC/C in ubiquitylation and cell cycle regulation [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 33(7): 667-73.
- [39] FRIEDERICHS J M, GHOSH S, SMOYER C J, et al. The SUN protein Mps3 is required for spindle pole body insertion into the nuclear membrane and nuclear envelope homeostasis [J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(11): e1002365.
- [40] CHEN C Y, CHI Y H, MUTALIF R A, et al. Accumulation of the inner nuclear envelope protein Sun1 is pathogenic in progeric and dystrophic laminopathies [J]. *Cell*, 2012, 149(3): 565-77.
- [41] SMOYER C J, SMITH S E, GARDNER J M, et al. Distribution of proteins at the inner nuclear membrane is regulated by the Asi1 E3 Ligase in *saccharomyces cerevisiae* [J]. *Genetics*, 2019, 211(4): 1269-82.
- [42] ZHENG C, GEETHA T, BABU J R. Failure of ubiquitin proteasome system: risk for neurodegenerative diseases [J]. *Neurodegener Dis*, 2014, 14(4): 161-75.
- [43] BURKE B, STEWART C L. Functional architecture of the cell's nucleus in development, aging, and disease [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2014, 109: 1-52.
- [44] DAHL K N, SCAFFIDI P, ISLAM M F, et al. Distinct structural and mechanical properties of the nuclear lamina in Hutchinson-Gilford progeria syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(27): 10271-6.
- [45] JANIN A, BAUER D, RATTI F, et al. Nuclear envelopathies: a complex LINC between nuclear envelope and pathology [J]. *Orphanet J of Rare Dis*, 2017, 12(1): 147.
- [46] HUANG X, DIXIT V M. Drugging the undruggables: exploring the ubiquitin system for drug development [J]. *Cell Res*, 2016, 26(4): 484-98.
- [47] FINLEY D, ULRICH H D, SOMMER T, et al. The ubiquitin-proteasome system of *saccharomyces cerevisiae* [J]. *Genetics*, 2012, 192(2): 319-60.
- [48] LERNER M, CORCORAN M, CEPEDA D, et al. The RBCC gene RFP2 (Leu5) encodes a novel transmembrane E3 ubiquitin ligase involved in ERAD [J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(5): 1670-82.
- [49] STAGG H R, THOMAS M, VAN DEN BOOMEN D, et al. The TRC8 E3 ligase ubiquitinates MHC class I molecules before dislocation from the ER [J]. *J Cell Biol* 2009, 186(5): 685-92.
- [50] VAN DEN BOOMEN D J, TIMMS R T, GRICE G L, et al. TMEM129 is a Derlin-1 associated ERAD E3 ligase essential for virus-induced degradation of MHC-I [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(31): 11425-30.
- [51] JIANG L Y, JIANG W, TIAN N, et al. Ring finger protein 145 (RNF145) is a ubiquitin ligase for sterol-induced degradation of HMG-CoA reductase [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(11): 4047-55.
- [52] LU J P, WANG Y, SLITER D A, et al. RNF170 protein, an endoplasmic reticulum membrane ubiquitin ligase, mediates inositol 1,4,5-trisphosphate receptor ubiquitination and degradation [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(27): 24426-33.
- [53] EL KHOURI E, LE PAVEC G, TOLEDANO M B, et al. RNF185 is a novel E3 ligase of endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) that targets cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(43): 31177-91.