



王冰洁, 韩娜, 韦怡林, 齐昆龙, 常乐彬, 张哲, 李新建, 李秀领, 王克君, 乔瑞敏, 杨峰, 韩雪蕾. 猪 *CRTC2* 基因的分子生物学特征及其功能预测分析[J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(01): 119-130.

WANG Bingjie, HAN Na, WEI Yilin, QI Kunlong, CHANG Lebin, ZHANG Zhe, LI Xinjian, LI Xiuling, WANG Kejun, QIAO Ruimin, YANG Feng, HAN Xuelei. Molecular biological characteristics and function prediction analysis of *CRTC2* gene in pig[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(01): 119-130.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.01.10

猪 *CRTC2* 基因的分子生物学特征及其功能预测分析

王冰洁¹ 韩娜² 韦怡林¹ 齐昆龙¹ 常乐彬¹ 张哲¹ 李新建³ 李秀领¹
王克君¹ 乔瑞敏¹ 杨峰¹ 韩雪蕾^{1*}

(1. 河南农业大学 动物科技学院, 郑州 450046;

2. 河南职业技术学院, 郑州 450046;

3. 海南省农业科学院, 海南 三亚 571100)

摘要 为分析猪 *CRTC2* 基因分子生物学特征及其功能, 本研究通过生物信息学方法对猪 *CRTC2* (CREB regulated transcription coactivator 2) 基因进行功能预测, 并对 *CRTC2* 基因的非同义单核苷酸多态性 (Non-synonymous single nucleotide polymorphisms, nsSNPs) 位点进行分析, 同时采用 qRT-PCR 方法检测其在猪不同组织中的表达情况。结果表明: 1) 猪 *CRTC2* 基因转录本 *CRTC2*-202 (ENSSSCT00000007195) 对应的基因座上存在 190 个 SNPs, 在编码区 (Coding sequence, CDS) 存在 10 个错义突变 (nsSNPs), 其中 rs709245010 位点导致第 148 位的脯氨酸 (P) 被亮氨酸 (L) 替代 (P148L), 该突变位点会降低蛋白质的稳定性, 从而影响其结构和功能。2) *CRTC2* 的 CDS 区的 m6A 修饰位点预测结果显示, 其不存在 m6A 修饰。3) *CRTC2* 基因的序列保守性和蛋白质二级结构稳定性预测结果显示, P148L 突变对 *CRTC2* 编码蛋白质的 α 螺旋、 β 转角等二级结构产生一定影响, 分析其可能是影响猪脂肪沉积和代谢的重要潜在功能性位点。4) 对与 *CRTC2* 互作的基因和蛋白质分别进行 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 富集分析, 结果显示富集到胰高血糖素信号通路和 Wnt 信号通路等多条与脂肪沉积和代谢相关的通路。5) qRT-PCR 结果表明, *CRTC2* 在长白猪的肝脏、腹脂和背脂中表达量显著高于其他组织 ($P < 0.05$)。综上, 本研究表明猪 *CRTC2* 基因上的 rs709245010 错义突变 (P148L) 可能会影响蛋白质结构和功能, 且该基因可能在猪脂肪沉积和代谢过程中发挥重要作用。本研究为探究猪 *CRTC2* 基因功能提供参考依据, 为进一步解析脂肪沉积和脂代谢机制提供研究思路。

关键词 猪; *CRTC2* 基因; 生物信息学分析; 脂质代谢; 功能预测

中图分类号 S828

文章编号 1007-4333(2025)01-0119-12

文献标志码 A

Molecular biological characteristics and function prediction analysis of *CRTC2* gene in pig

WANG Bingjie¹, HAN Na², WEI Yilin¹, QI Kunlong¹, CHANG Lebin¹, ZHANG Zhe¹,
LI Xinjian³, LI Xiuling¹, WANG Kejun¹, QIAO Ruimin¹, YANG Feng¹, HAN Xuelei^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China;

2. Henan Polytechnic, Zhengzhou 450046, China;

3. Hainan Academy of Agricultural Sciences, Sanya 571100, China)

收稿日期: 2024-03-05

基金项目: 科技创新 2030-重大项目 (2023ZD04046); 国家“十四五”重点研发计划项目 (2021YFD1301202); 河南省农业良种联合攻关项目 (2022020101)。

第一作者: 王冰洁 (ORCID: 0009-0008-3314-2706), 硕士研究生, E-mail: 15294768148@163.com

通讯作者: 韩雪蕾 (ORCID: 0000-0002-7957-0297), 教授, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: hxl014@126.com

Abstract In order to explore the molecular biological characteristics and functions of porcine *CRTC2* gene, this paper predicted the functions of porcine *CRTC2* (CREB regulated transcription coactivator 2) by bioinformatics methods. The non-synonymous single nucleotide polymorphisms (nsSNPs) of *CRTC2* gene were analyzed, and its expression in different pig tissues was detected by qRT-PCR. The results showed as follows: 1) There were 190 SNPs in the locus corresponding to pig *CRTC2* transcript *CRTC2*-202 (ENSSSCT00000007195), and 10 missense mutations (nsSNPs) in Coding sequence (CDS). rs709245010 causes proline (P) at position 148 to be replaced by leucine (L) (P148L), and this mutation site reduces the stability of the protein, thereby affecting its structure and function. 2) The prediction results of m6A modification site in CDS region of *CRTC2* showed that there was no m6A modification. 3) The prediction results of sequence conservation and protein secondary structure stability of *CRTC2* gene showed that P148L mutation had certain effects on the α helix, β corner and other secondary structures of *CRTC2*-encoded proteins, and it may be an important potential functional site affecting pig fat deposition and metabolism. 4) KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) enrichment analysis was conducted for the genes and proteins interacting with *CRTC2* respectively. The results showed that several pathways related to fat deposition and metabolism, such as glucagon signaling pathway and Wnt signaling pathway, were enriched respectively. 5) qRT-PCR results showed that the expression level of *CRTC2* in liver, abdominal fat and back fat of Landrace pigs was significantly higher than that in other tissues ($P < 0.05$). In conclusion, this study found that rs709245010 missense mutation (P148L) on pig *CRTC2* gene may affect protein structure and function, and this gene may play an important role in pig fat deposition and metabolism. This study provides reference for exploring the function of pig *CRTC2* gene, and provides research ideas for further analyzing the mechanism of fat deposition and lipid metabolism.

Keywords pig; *CRTC2* gene; bioinformatics analysis; lipid metabolism; function prediction

中国是全球最大的猪肉生产和消费国,近年来生产高品质猪肉已成为养猪业发展目标。脂肪组织主要包括皮下脂肪、内脏脂肪和肌内脂肪,其中皮下脂肪和内脏脂肪在不同部位起着保温、支撑、储能、保护等功能,而肌内脂肪分布在肌肉组织内部,是形成猪肉大理石纹的关键,对猪肉的嫩度、风味和多汁性等感官品质具有重要影响^[1]。脂肪沉积过程受多种信号调控,例如:脂肪酸结合蛋白(FABPs)家族中的心脏型(H-FABP)和脂肪细胞型(A-FABP)可以促进心脏和脂肪中甘油三酯的沉积,进而促进肌内脂肪的积累^[2];过氧化物激活物受体 γ (PPAR γ)和CCAAT-增强子结合蛋白(C/EBP)是控制脂肪细胞形成的关键因子^[3];另外,环磷酸腺苷-蛋白激酶A(cAMP-PKA)信号通路通过下游的cAMP反应元件结合蛋白(cAMP response element-binding protein, CREB)和其共激活剂转录辅活化因子(CRTEs)发挥作用调控能量平衡^[4]。肌肉组织中的非编码RNA也参与调节肌内脂肪沉积过程,影响脂肪形成^[5]。因此,脂肪沉积是营养与遗传因素二者相互作用的结果,对动物生产效益和肉质具有重要影响。

CRTC2 (CREB-regulated transcription coactivator

2)是CREB的转录共激活因子之一,CREB家族有*CRTC1*、*CRTC2*和*CRTC3*成员。*CRTC1*在大脑组织中高度表达,*CRTC2*主要在肌肉和肝脏中表达,*CRTC3*主要在肺组织和淋巴细胞中表达。除了作为CREB的共激活因子外,*CRTC2*还参与能量代谢的调控,*CRTC2*在空腹和饥饿信号(如胰高血糖素、肾上腺素下降等)传导下,结合相应受体,激活cAMP-PKA信号通路,导致*CRTC2*被激活并进入细胞核与CREB结合,从而促进胰岛素基因的转录,调节机体的血糖平衡^[6]。此外,*CRTC2*还与其他转录因子相互作用,调控脂肪酸合成、糖原合成和分解等代谢通路的基因转录^[7]。前期研究发现,与脂质代谢相关的miR-149-5p过表达显著降低了*CRTC2*的mRNA表达,表明miR-149-5p可能阻止*CRTC2*的表达,从而抑制Ca²⁺信号通路和脂质沉积^[8]。

非同义单核苷酸多态性(Non-synonymous single nucleotide polymorphisms, nsSNPs)是发生在编码区(Coding sequence, CDS)的单个核苷酸突变,导致氨基酸序列改变,这种变异一般是由单个碱基的转换、颠换引起^[9]。因其可能对蛋白质的空间结构和功能产生影响,通常被认为是动植物表型和基因型变异的重要原因之一。目前,关于猪*CRTC2*

基因的nsSNPs在调控猪脂肪沉积和代谢方面的作用机制尚不明确,因而本研究通过生物信息学分析,挖掘猪CRTC2基因CDS区的nsSNPs,筛选可能影响猪肉品质的功能性突变位点,预测其可能的作用机理,并对其相互作用基因和蛋白进行KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes)富集分析,随后通过qRT-PCR检测猪CRTC2基因在不同组织中的相对表达水平。本研究有助于理解猪CRTC2基因调控脂质代谢的作用机制,为挖掘脂肪沉积和代谢机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 猪CRTC2基因SNPs的检索及m6A甲基化位点预测

从Ensembl数据库(<http://asia.ensembl.org/index.html>)中检索位于猪CRTC2基因外显子区、内含子区、3'UTR(Untranslated region)和5'UTR上的SNPs,并筛选出在外显子区域上的nsSNPs。使用SRAMP在线网站(<https://www.cuilab.cn/sramp>)预测CRTC2的CDS区的N6-甲基腺苷(m6A)修饰位点,为确保低错误率,以高置信度(high confidence)预测的m6A位点作为其是否具有m6A修饰的标准^[10]。

1.2 猪CRTC2基因nsSNPs功能预测

本研究利用SNAP(<http://www.rostlab.org/services/SNAP>)、SIFT(<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>)和Polyphen-2(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>)方法预测位于CRTC2基因CDS区的nsSNPs的功能。SNAP主要预测SNPs的功能效应,其预测结果可分为中性(Neutral)和有影响(Effect)。SIFT基于氨基酸的物理特性和序列同源,主要用于检测氨基酸替换是否会导致蛋白质功能的变化,其得分越低,表明引起蛋白质功能改变的可能性越大^[11]。Polyphen-2主要进行氨基酸替换改变蛋白质结构和功能可能性的预测,分数越接近1.0,改变蛋白质结构和功能的可能性越大,阈值为0.50。

1.3 猪CRTC2基因编码蛋白质的进化保守性位点预测和进化树分析

使用MEGA11对CRTC2的核苷酸和其编码蛋白质的氨基酸组成进行分析,并对CRTC2编码蛋白质的氨基酸序列进行同源比对。同时,利用在线工具

ConSurf(<https://consurf.tau.ac.il/>)分析CRTC2编码蛋白质的氨基酸序列中各位点的进化保守水平。

1.4 猪CRTC2编码的蛋白质稳定性预测

利用在线网站I-Mutant 2.0和Mupro(<http://mupro.proteomics.ics.uci.edu/>)预测CRTC2单点突变后编码蛋白质的稳定性,评估结果中自由能变化值<0表示蛋白质的稳定性降低,>0则相反。

1.5 猪CRTC2编码的蛋白质二级结构预测

通过Sopma(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)对猪CRTC2基因突变体编码的蛋白质二级结构进行预测和分析,进而确定该突变位点可能造成的影响^[23]。

1.6 CRTC2及其互作基因/蛋白KEGG通路富集分析

通过GeneMANIA(<http://genemania.org/>)和STRING(<https://cn.string-db.org/>)软件分别对CRTC2基因以及其互作基因,CRTC2编码蛋白(F1SFW7)及其互作蛋白进行预测和分析,进而预测这些通路可能发挥的作用。

1.7 组织表达谱分析

使用TRizol法提取各组织总RNA,使用逆转录试剂盒、SYBR Green Premix Pro Taq HS qPCR试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司)对RNA样品进行反转录和qPCR检测,具体操作参照试剂盒说明书进行。采用两步法进行扩增,qPCR反应体系为10 μ L,生物学重复设置为3。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量,并以GAPDH作为内参对照。

2 结果与分析

2.1 猪CRTC2序列组成分析及m6A甲基化位点预测

利用MEGA11对CRTC2基因的氨基酸和碱基组成进行分析。结果发现,Ser(丝氨酸)、Pro(脯氨酸)、Leu(亮氨酸)在氨基酸组成中占比较大;碱基C在碱基组成类别中占比最高,而T(U)最低(表1和图1)。此外,CRTC2编码的蛋白质分子量为73 143.85 g/mol,等电点为7.038 5。通过SRAMP网站对CRTC2的CDS区的N6-甲基腺苷(m6A)修饰位点进行预测,发现其CDS区仅存在3个中度可信的位点(Moderate confidence),此结果表明CRTC2的CDS区不存在m6A修饰(图2)。

表1 *CRTC2*编码的蛋白质序列中各种氨基酸占比

Table 1 The proportion of various amino acids in the protein sequence encoded by *CRTC2*

氨基酸 Amino acid	占比/% Percentage	氨基酸 Amino acid	占比/% Percentage
Ala	6.49	Met	2.16
Cys	0.72	Asn	3.03
Asp	3.46	Pro	14.43
Glu	4.33	Gln	4.91
Phe	2.31	Arg	5.05
Gly	8.80	Ser	15.01
His	3.46	Thr	4.91
Ile	1.73	Val	2.89
Lys	2.02	Trp	0.43
Leu	11.83	Tyr	2.02

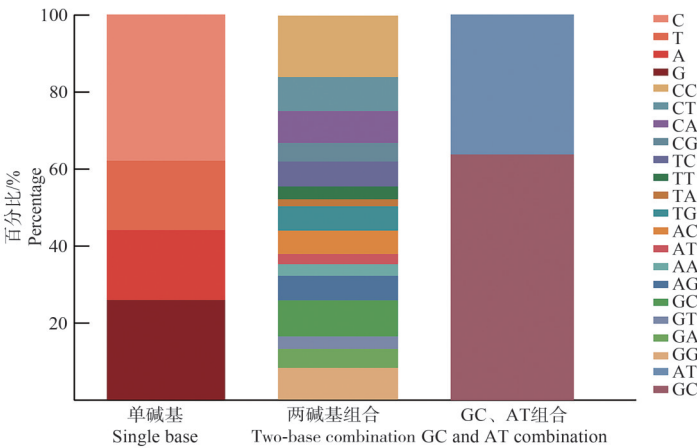


图1 *CRTC2*基因中各种碱基分布图

Fig. 1 Distribution of various bases in the *CRTC2* gene

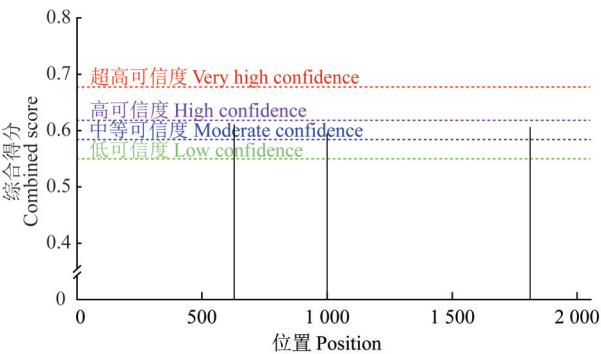


图2 *CRTC2*的m6A修饰位点预测

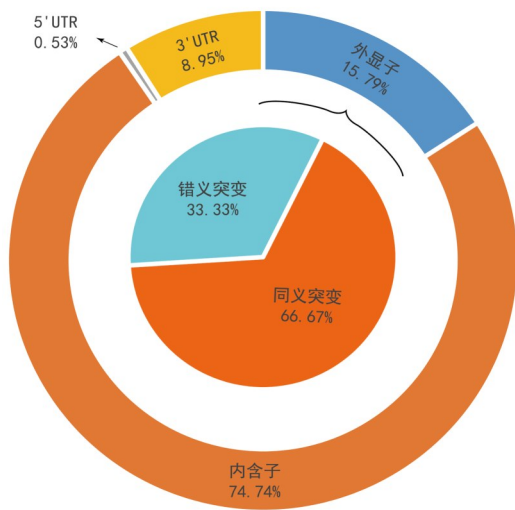
Fig. 2 m6A modification site prediction of *CRTC2*

2.2 猪*CRTC2*基因上的SNPs及nsSNPs分布

从Ensembl数据库中检索到猪*CRTC2*基因的转录本*CRTC2*-202对应的基因座上存在190个SNPs,其中17个位于3' UTR区、1个位于5' UTR区、142个位于内含子区、30个位于外显子区。其中CDS区中有10个错义突变,即nsSNPs(图3)。

2.3 猪*CRTC2*基因功能性nsSNPs预测

本研究利用SNAP、SIFT和Polyphen-2方法预测*CRTC2*基因上的nsSNPs的功能。这3个网站分别预测到8个、3个和1个非中性的nsSNPs;共预测

图3 猪 *CRTC2* 基因的 SNPs 分布图Fig. 3 SNPs distribution of pig *CRTC2* gene

到 9 个潜在影响 *CRTC2* 编码蛋白功能的 nsSNPs, 分别为 rs709245010(P148L)、rs337849183(S199I)、rs1107669551(P567S)、rs699432551(V591M)、rs709060088(S592G)、rs695272651(E596D)、rs705078240(L600F)、rs694414401(R610H) 和 rs318352528(G621R)(表 2)。

2.4 猪 *CRTC2* 基因编码蛋白质的进化保守性位点预测和进化树分析

2.4.1 *CRTC2* 基因编码蛋白质的进化保守性位点预测

利用在线工具 ConSurf 预测转录本 *CRTC2*-202 对应基因座上的 nsSNPs 位点的保守性, 结果显示, rs709245010(P148L) 是高度保守并暴露的功能性位点, 因此推测该保守性强的位点突变可能对其蛋白质功能产生一定影响(表 3 和图 4)。

表 2 SIFT、Polyphen-2 和 SNAP 预测猪 *CRTC2* 基因功能性 nsSNPsTable 2 SIFT, Polyphen-2 and SNAP predicted functional nsSNPs of porcine *CRTC2* gene

SNP 登录号 SNP registration number	氨基酸变异 Amino acid variation	SNAP		SIFT		Polyphen-2	
		预测结果 Forecasting result	预期准确率/% Expected accuracy	得分 Score	预测结果 Forecasting result	得分 Score	分类 Classify
rs709245010	P148L	netural	66	0	非中性	0.998	非中性
rs787224500	P192S	netural	57	0.70	中性	0.013	中性
rs337849183	S199I	effect	63	0.18	中性	0.143	中性
rs1107669551	P567S	effect	63	0.14	中性	—	—
rs699432551	V591M	effect	53	0.30	中性	—	—
rs709060088	S592G	effect	59	0.43	中性	—	—
rs695272651	E596D	effect	53	1	中性	—	—
rs705078240	L600F	effect	63	0.03	非中性	—	—
rs694414401	R610H	effect	71	0.56	中性	—	—
rs318352528	G621R	effect	75	0	非中性	—	—

2.4.2 *CRTC2* 基因编码蛋白质的进化树分析

在 NCBI 中的 Protein Blast 数据库检索发现该序列在人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、牛(*Bos taurus*)、猪(*Sus scrofa*)、野兔(*Oryctolagus cuniculus*)、绵羊(*Ovis aries*)之间高度同源, 利用 MEGA11 对 *CRTC2* 编码蛋白质的氨基酸序列进行比对, 结果显示, 在本研究中 rs709245010(P148L) 多态位点在除人外的物种中均表现出其

保守性(图 5(a))。进化树分析显示, 猪和牛、绵羊最近, 但是与人、野兔和小鼠相对较远(图 5(b))。

2.5 猪 *CRTC2* 编码蛋白质稳定性预测

使用 Mupro 工具评估 nsSNPs 对蛋白质稳定性的影响, 发现除 rs337849183(S199I) 突变位点外, rs709245010(P148L) 等 9 个突变位点均会使 *CRTC2* 编码的蛋白质稳定性降低(表 4)。

表3 ConSurf预测猪CRTC2基因功能性nsSNPs

Table 3 ConSurf predicted functional nsSNPs of porcine CRTC2 gene

SNP 登录号	氨基酸变异	保守性	类别
SNP registration number	Amino acid variation	Conservatism	Category
rs709245010	P148L	ef	保守
rs787224500	P192S	e	不保守
rs337849183	S199I	e	不保守
rs1107669551	P567S	e	不保守
rs699432551	V591M	e	不保守
rs709060088	S592G	e	不保守
rs695272651	E596D	e	不保守
rs705078240	L600F	e	不保守
rs694414401	R610H	e	不保守
rs318352528	G621R	e	不保守

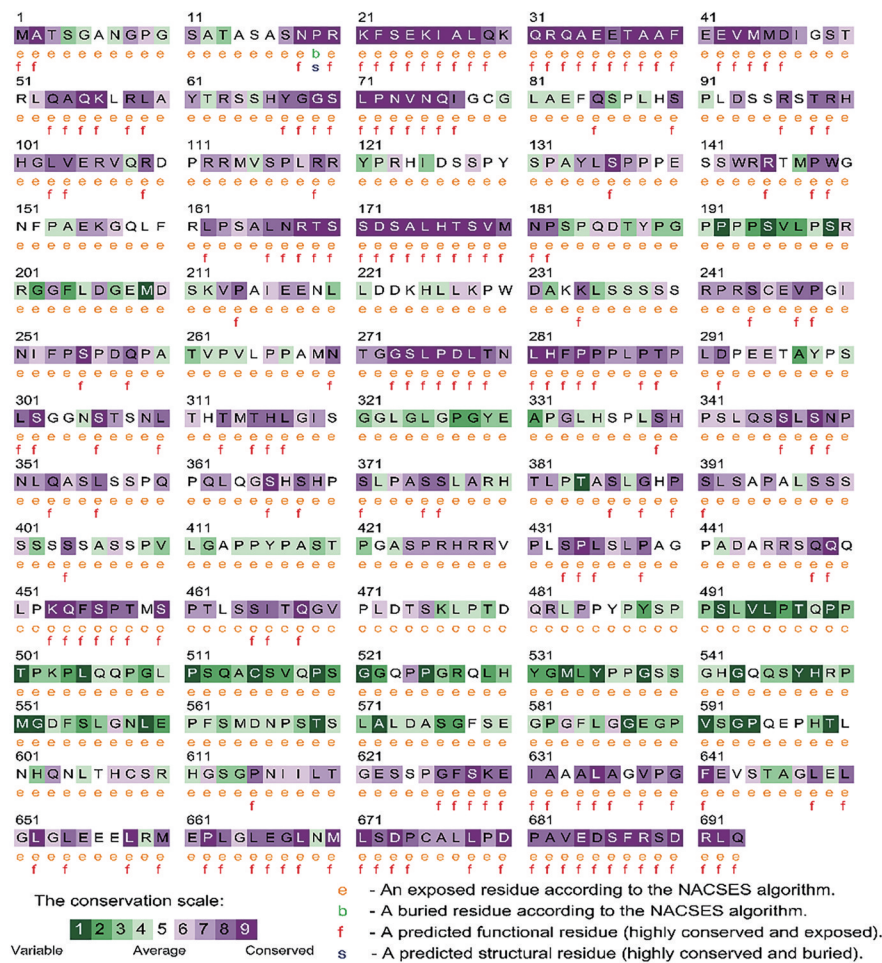
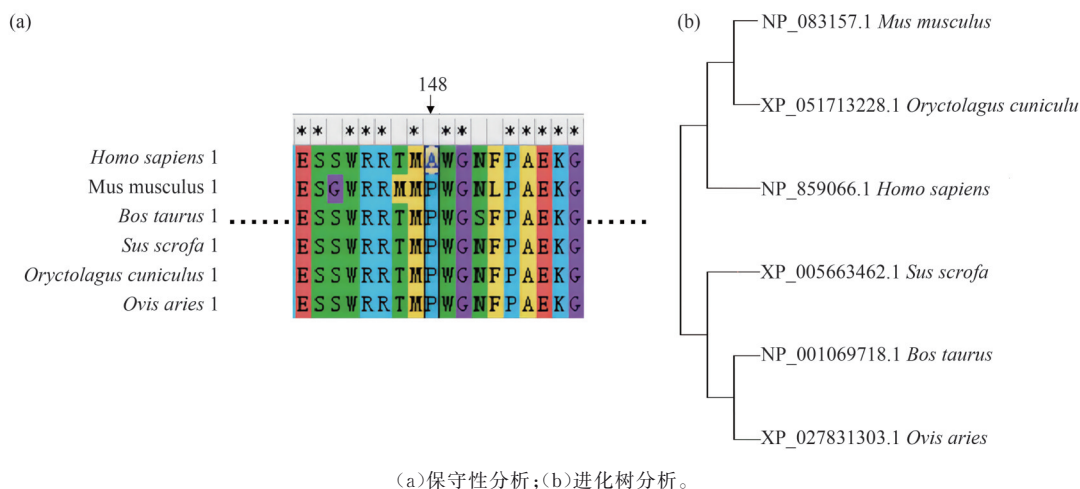


图4 猪CRTC2编码蛋白质的氨基酸进化保守性的预测

Fig. 4 Prediction of amino acid evolution conservation of porcine CRTC2 encoded protein

图 5 *CRTC2* 编码蛋白质序列分析Fig. 5 Analysis of *CRTC2*-encoded protein sequences表 4 I-Mutant2.0 和 Mupro 预测猪 *CRTC2* 基因功能性 nsSNPsTable 4 I-Mutant2.0 and Mupro predicted functional nsSNPs of porcine *CRTC2* gene

SNP 登录号 SNP registration number	氨基酸变异 Amino acid variation	I-Mutant2.0		Mupro	
		自由能变化 Free energy change	分类 Classify	自由能变化 Free energy change	分类 Classify
rs709245010	P148L	1.24	增加	-0.08	降低
rs787224500	P192S	-1.8	降低	-0.44	降低
rs337849183	S199I	-0.21	降低	0.01	增加
rs1107669551	P567S	-1.87	降低	-1.23	降低
rs699432551	V591M	-2.04	降低	-0.21	降低
rs709060088	S592G	-0.96	降低	-0.79	降低
rs695272651	E596D	-0.12	降低	-0.66	降低
rs705078240	L600F	0.86	增加	-0.40	降低
rs694414401	R610H	-0.68	降低	-1.60	降低
rs318352528	G621R	-1.33	降低	-0.33	降低

2.6 rs709245010(P148L)突变位点蛋白质二级结构分析

根据上述预测分析,rs709245010(P148L)位点可能是重要的 nsSNPs 突变位点。利用在线软件 Sopma 对这个突变位点的蛋白质二级结构进行预测。结果显示,*CRTC2* 编码蛋白质的野生型二级结构中 α 螺旋占 19.19%、延伸链占 6.93%、 β 转角占

7.07%、无规则卷曲占 66.81%。其中 rs709245010(P148L) 突变位点导致无规则卷曲比率降至 65.66%, β 转角比率提高至 7.22%,延伸链百分比提高至 7.36%,并且导致 α 螺旋百分比提高至 19.77%。因此 rs709245010(P148L) 位点的突变造成了 *CRTC2* 编码的蛋白质二级结构的改变(表 5)。

表 5 rs709245010(P148L)位点突变前后蛋白质二级结构分析

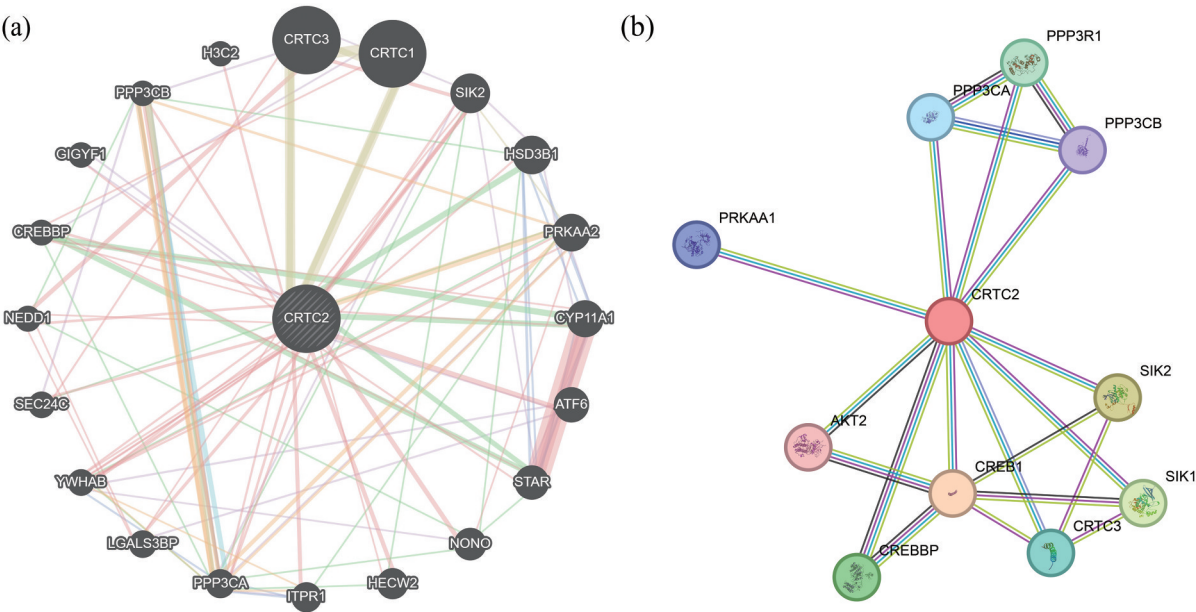
Table 5 Protein secondary structure analysis before and after rs709245010 (P148L) mutation

类型 Type	野生型/% Wild type	rs709245010(P148L)
α 螺旋	19.19	19.77
延伸链	6.93	7.36
β 转角	7.07	7.22
无规则卷曲	66.81	65.66

2.7 CRTC2 互作基因和蛋白质预测及其 KEGG 通路富集分析

通过 GeneMANIA 和 STRING 软件分别对 CRTC2 基因及其互作基因,以及 CRTC2 编码蛋白

及其互作蛋白进行预测和分析,结果发现,CRTC3、CRTC1与 CRTC2 基因存在较强的互作关系(图 6(a));CREBBP与 CRTC2 编码的蛋白质存在较强的互作关系(图 6(b))。



(a) CRTC2 基因相关互作基因预测;(b)相关互作蛋白预测。
(a) Prediction of CRTC2 gene-related interaction genes; (b) Related interaction proteins.

图 6 CRTC2 互作基因和互作蛋白预测分析

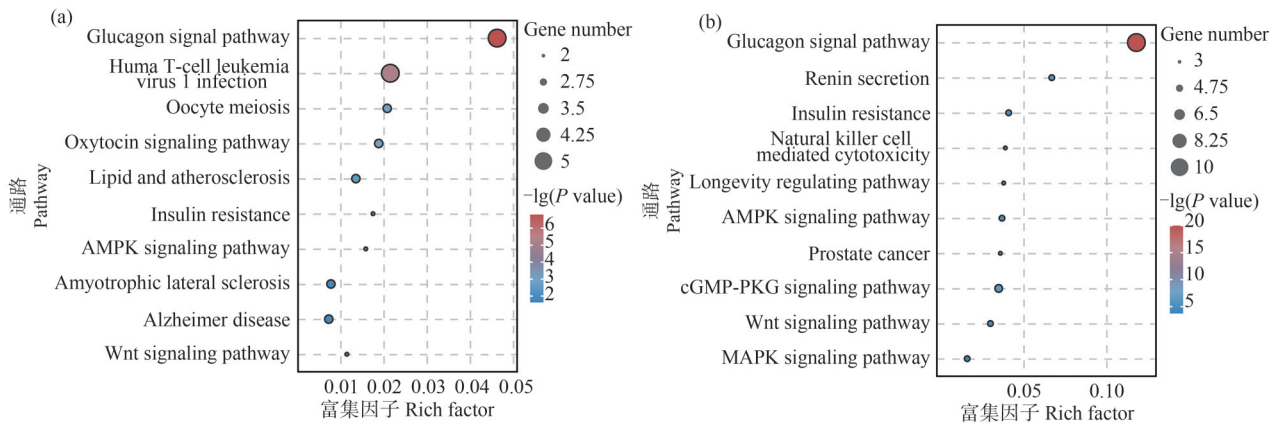
Fig. 6 Prediction analysis of CRTC2 interacting genes and interacting proteins

为进一步确定 CRTC2 基因的功能,本研究通过对与 CRTC2 互作基因及蛋白质进行 KEGG 通路富集分析。结果发现,CRTC2 及其互作基因主要参与胰高血糖素信号通路和脂质和动脉粥样硬化等脂质代谢和肌肉发育相关通路(图 7(a));CRTC2 及其互作蛋白质主要参与胰高血糖素信号通路和 cGMP-PKG 信号通路等脂质代谢和肌肉发育相关通路(图 7(b))。因此,推测 CRTC2 可能对脂质代

谢有重要作用。

2.8 CRTC2 基因在猪肌肉和脂肪相关组织中的表达谱分析

为进一步探索 CRTC2 在脂肪沉积和肌肉发育中的作用,本研究通过 qRT-PCR 分析其在长白猪的不同组织中的表达情况,结果显示,CRTC2 在长白猪的肝脏中表达量显著高于其他组织 ($P<0.05$),其次是腹脂和背脂,其表达量均显著高于背肌和腿肌 ($P<0.05$)(图 8)。



(a) *CRTC2* 交互基因 KEGG 通路富集分析; (b) 交互蛋白 KEGG 通路富集分析。

(a) *CRTC2* interaction gene KEGG pathway enrichment analysis; (b) Interaction protein KEGG pathway enrichment analysis.

图 7 *CRTC2* 交互基因和交互蛋白的 KEGG 通路富集分析

Fig. 7 KEGG pathway enrichment analysis of *CRTC2* interacting genes and interacting proteins

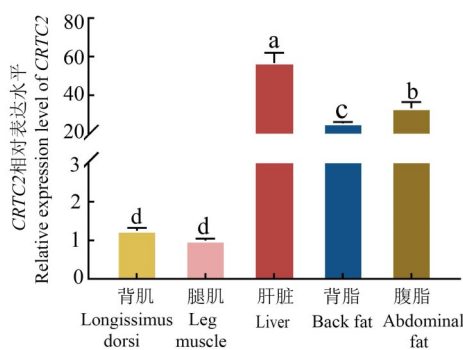


图 8 *CRTC2* 在各组织中的相对表达量

Fig. 8 The relative expression of *CRTC2* in different tissues

3 讨论

3.1 *CRTC2* 生物信息学分析

m6A 是一种转录后甲基化修饰,广泛存在于 RNA 转录本的腺苷碱基上。这种修饰被认为参与 RNA 转录本的降解、亚细胞定位和剪接等的调节。为进一步探究 *CRTC2* 是否存在 m6A 修饰,本研究通过预测发现其 CDS 区仅存在 3 个中度可信的位点,因此认为其 CDS 区不存在 m6A 修饰。本研究运用软件对猪 *CRTC2* 基因外显子区的功能性 nsSNPs 进行预测,预测结果显示,rs709245010 (P148L) 突变导致 *CRTC2* 编码的蛋白质结构发生改变,并且蛋白质的稳定性降低。由于保守序列在生物体生存中起着重要作用,错义突变可能降低蛋白质的稳定性,从而导致疾病发生^[12]。本研究对 *CRTC2* 编码的蛋白质的稳定性和二级结构进行预

测,蛋白质的二级结构变化会影响其稳定性,进而调控蛋白的翻译过程。此外,rs709245010 (P148L) 突变将脯氨酸替换为亮氨酸,亮氨酸作为支链氨基酸,在脂肪细胞分化和脂肪积累中扮演关键角色。据报道,亮氨酸对脂质代谢具有调节作用,能够促进脂肪分解和抑制脂肪合成^[13]。因此,本研究推测 rs709245010 (P148L) 位点可能是影响猪脂肪沉积和代谢的重要功能性突变位点。本研究为后续深入研究 rs709245010 (P148L) 位点突变对 *CRTC2* 基因功能的影响提供参考。

3.2 *CRTC2* 可能参与脂质代谢调节过程

脂质代谢是一个复杂的过程,涉及脂肪合成和分解代谢、脂滴变化、脂肪沉积等多个关键过程。*CRTC2* 是 CREB 家族的成员,在 CREB 介导的转录激活中扮演着关键角色。早期研究表明,*CRTC2* 在调节葡萄糖代谢和脂质代谢方面具有重要功能,它通过影响 cAMP 信号传导途径调节葡萄糖代谢、甾醇调节元件结合蛋白 1 (SREBP1) 和甾醇调节元件结合蛋白 2 (SREBP2) 来影响脂质代谢^[14],并且可以通过去磷酸化的方式影响碳水化合物代谢^[15]。此外,*CRTC2* 对脂肪沉积和脂质代谢产生影响。研究发现,*CRTC2* 参与调控脂肪细胞发育和脂肪合成的关键信号通路,并与其他调控脂质代谢的关键蛋白质如 AMPK 和盐诱导激酶 SIK2 等相互作用,共同调节脂肪沉积过程。*CRTC2* 在细胞中受到多种信号通路的调控,包括 cAMP-PKA 和 Ca^{2+} -calmodulin 依赖性信号传导。当细胞内的 cAMP 或 Ca^{2+} 水平增加,激活 PKA 或 Ca^{2+} -calmodulin 依赖性

激酶,进而导致 *CRTC2* 从细胞质转移到细胞核,在细胞核内, *CRTC2* 与 CREB 结合并激活下游基因转录^[16]。

为进一步探讨其作用,对与 *CRTC2* 基因的互作基因进行预测和分析,结果显示, *CRTC2* 与 *CRTC3*、*CRTC1* 存在较强的相互作用,相关研究表明 *CRTC3* 通过 Ca^{2+} -cAMP 信号通路在调节脂质代谢和脂肪生成起着重要作用,同时, *CRTC3* 还通过调节与脂质代谢相关的基因,促进磷脂的形成增加,从而扩大脂肪细胞以增加脂质储存^[17]; *CRTC1* 选择性介导肝脏中 cAMP 信号传导的有益抗脂肪变性作用,且 *CRTC1* 广泛抑制促进肝脏脂质积累基因的表达^[18]。此外,结果发现 *CRTC2* 编码的蛋白质与 CREBBP 蛋白相互作用, CREBBP 作为共激活因子,研究发现 CREB 部分通过刺激转录激活因子 3(ATF3)的表达来损害脂肪细胞功能, ATF3 是一种与脂联素和葡萄糖转运蛋白-4(GLUT4)结合并抑制转录的阻遏蛋白。除了对 ATF3 的影响外, CREB 还可以调节影响脂肪细胞脂质代谢的其他细胞基因的表达^[19-20]。例如, CREB 通过激活 *C/EBP β* 引发 *C/EBP α* 和 *PPAR γ* 基因的表达,从而启动脂肪细胞表型相关基因的转录^[21]。通过 KEGG 富集分析发现,与 *CRTC2* 相互作用的基因和蛋白参与胰高血糖素信号通路和 Wnt 信号通路等多条脂质代谢相关通路,其中胰高血糖素信号通路通过 AMPK 信号通路激活减弱脂质积累^[22], Wnt 信号通路是脂肪生成中最重要的调控通路, Wnt 信号转导通过抑制成脂转录因子 *C/EBP α* 和 *PPAR γ* 抑制脂肪细胞的分化和脂肪生成^[23]。肝脏是脂肪沉积的关键器官^[24],且 *CRTC2* 在调节脂质代谢和控制肝脏胆固醇合成中起着至关重要的作用^[25-26]。

qRT-PCR 结果表明 *CRTC2* 在长白猪的肝脏、背脂和腹脂等脂肪代谢相关组织中表达量较高,进一步表明 *CRTC2* 可能在脂肪沉积和代谢过程中发挥重要作用。据报道, *CRTC2* 在未受刺激的肝细胞中高度磷酸化,并且主要定位于细胞质中。在用胰高血糖素或诱导细胞 cAMP 升高的刺激物处理后, *CRTC2* 被去磷酸化并易位到细胞核^[27-28]。 SIK2 是 AMPK 相关激酶家族的成员,在肝脏中, SIK2 作为 LKB1(Liver kinase B1)的下游糖异生抑制因子,其抑制剂 HG-9-91-01 能够促进转录共激活因子 *CRTC2* 的去磷酸化,从而增强肝细胞中糖异生基因

的表达和葡萄糖产生^[29]。因此推测 *CRTC2* 可能在调节脂质代谢方面发挥作用,其为解析猪 *CRTC2* 基因在脂质代谢中的功能提供了参考依据。

4 结 论

本研究通过对猪 *CRTC2* 基因进行生物学特征和功能预测分析,发现了猪 *CRTC2* 基因上的 rs709245010 错义突变位点(P148L),其可能影响 *CRTC2* 编码的蛋白质结构及其稳定性; *CRTC2* 基因参与多条与脂肪代谢相关的通路,且在肝脏中的表达量显著高于其他组织。本研究为进一步挖掘猪 *CRTC2* 基因功能提供参考依据,对解析猪脂质代谢调控机制具有参考意义。

参考文献 References

- [1] 史寒婧, 郭鑫, 郭秋平, 李凤娜. 肌肉-脂肪组织互作调节肌内脂肪沉积的分子机制研究进展[J]. 动物营养学报, 2023, 35(8): 4910-4919
Shi H J, Guo L, Guo Q P, Li F N. Research progress on molecular mechanism of muscle-adipose tissue interaction regulating intramuscular fat deposition[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2023, 35(8): 4910-4919 (in Chinese)
- [2] 宿甲子, 孙肖明, 孟宪梅. 肌内脂肪对猪肉品质的影响及研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息, 2020(10): 19-20
Su J Z, Sun X M, Meng X M. Effect of intramuscular fat on pork quality and its research progress[J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2020(10): 19-20 (in Chinese)
- [3] 吴婷, 敖翔, 何健. 肌内脂肪与肉品质关系及其营养调控策略[J]. 养猪, 2021(4): 50-54
Wu T, Ao X, He J. Relationship between intramuscular fat and meat quality and its nutritional regulation strategy[J]. *Swine Production*, 2021(4): 50-54 (in Chinese)
- [4] 徐子叶, 吴纬澈, 汪以真, 单体中. 调控肌内脂肪沉积的分子机制研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2018, 54(5): 1-5
Xu Z Y, Wu W C, Wang Y Z, Shan T Z. Research progress on molecular mechanism of regulating intramuscular fat deposition[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2018, 54(5): 1-5 (in Chinese)
- [5] Qi K L, Liu Y K, Li C L, Li X J, Li X L, Wang K J, Qiao R M, Han X L. Construction of circRNA-related ceRNA networks in longissimus dorsi muscle of Queshan Black and Large White pigs[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2022, 297(1): 101-112
- [6] 陈亚琼, 刘涓. cAMP-CREB 信号转录通路新成员: CRTCs 的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2010, 32(4): 509-517
Chen Y Q, Liu Y. CRTCs: An essential coactivator family of CREB regulated transcription[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2010, 32(4): 509-517 (in Chinese)

- [7] Amelio A L, Caputi M, Conkright M D. Bipartite functions of the CREB co-activators selectively direct alternative splicing or transcriptional activation[J]. *The EMBO Journal*, 2009, 28(18): 2733-2747
- [8] Liu Y K, Dou Y Q, Qi K L, Li C L, Song C L, Li X J, Li X L, Qiao R M, Wang K J, Han X L. CircSETBP1 acts as a miR-149-5p sponge to promote intramuscular fat deposition by regulating CRTCs[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(40): 12841-12851
- [9] Rajasekaran R, Sethumadhavan R. Exploring the structural and functional effect of pRB by significant nsSNP in the coding region of RB1 gene causing retinoblastoma [J]. *Science China Life Sciences*, 2010, 53(2): 234-240
- [10] Zhou Y, Zeng P, Li Y H, Zhang Z D, Cui Q H. SRAMP: Prediction of mammalian N6-methyladenosine (m6A) sites based on sequence-derived features[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(10): e91
- [11] 王乾坤. KRAS 基因中肺癌相关的 nsSNPs 筛选与模拟研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2019
- Wang Q K. Computational screening deleterious non-synonymous single nucleotide polymorphisms and molecular dynamic simulation of lung cancer associated mutations in KRAS gene[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2019 (in Chinese)
- [12] 赵采芹, 王燕碧, 唐宏, 邢静如, 石海英, 段志强. 鸡 TRAF6 基因外显子区功能性 SNP 预测与分析[J]. *山地农业生物学报*, 2022, 41(1): 1-10
- Zhao C Q, Wang Y B, Tang H, Xing J R, Shi H Y, Duan Z Q. Prediction and analysis of functional SNP on exon region of chicken TRAF6 gene[J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2022, 41(1): 1-10 (in Chinese)
- [13] Zhang L Y, Li F N, Guo Q P, Duan Y H, Wang W L, Zhong Y Z, Yang Y H, Yin Y L. Leucine supplementation: A novel strategy for modulating lipid metabolism and energy homeostasis [J]. *Nutrients*, 2020, 12(5): 1299
- [14] Han J B, Li E W, Chen L Q, Zhang Y Y, Wei F C, Liu J Y, Deng H T, Wang Y G. The CREB coactivator CRTC2 controls hepatic lipid metabolism by regulating SREBP1[J]. *Nature*, 2015, 524: 243-246
- [15] Zheng H Y, Wang Y X, Zhou K, Xie H L, Ren Z, Liu H T, Ou Y S, Zhou Z X, Jiang Z S. Biological functions of CRTC2 and its role in metabolism-related diseases [J]. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 2023, 17(3): 495-506
- [16] 李慧阁, 傅力. CREB 辅活因子 CRTC2 在调节糖、脂代谢及应激反应中的作用[J]. *中国运动医学杂志*, 2016, 35(1): 94-98
- Li H G, Fu L. Role of CREB coactivator CRTC2 in regulating glucose and lipid metabolism and stress response[J]. *Chinese Journal of Sports Medicine*, 2016, 35(1): 94-98 (in Chinese)
- [17] Liu J Q, Wang L Y, Chen W T, Li J, Shan T Z. CRTC3 regulates the lipid metabolism and adipogenic differentiation of porcine intramuscular and subcutaneous adipocytes by activating the calcium pathway [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(25): 7243-7255
- [18] Kim H. The transcription cofactor CRTC1 protects from aberrant hepatic lipid accumulation[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37280
- [19] Mochizuki K, Honma K, Shimada M, Goda T. The regulation of jejunal induction of the maltase-glucoamylase gene by a high-starch/low-fat diet in mice[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010, 54(10): 1445-1451
- [20] Qi L, Saberi M, Zmuda E, Wang Y G, Altarejos J, Zhang X M, Dentin R, Hedrick S, Bandyopadhyay G, Hai T, Olefsky J, Montminy M. Adipocyte CREB promotes insulin resistance in obesity [J]. *Cell Metabolism*, 2009, 9(3): 277-286
- [21] Zhang J W, Klemm D J, Vinson C, Lane M D. Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(6): 4471-4478
- [22] Li Y, Ding H Y, Dong J H, Rahman S U, Feng S B, Wang X C, Wu J J, Wang Z, Liu G W, Li X B, Li X W. Glucagon attenuates lipid accumulation in cow hepatocytes through AMPK signaling pathway activation[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(5): 6054-6066
- [23] Ross S E, Hemati N, Longo K A, Bennett C N, Lucas P C, Erickson R L, MacDougald O A. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling [J]. *Science*, 2000, 289(5481): 950-953
- [24] Chen W W, Ma H M, Li B, Yang F, Xiao Y, Gong Y, Li Z, Li T, Zeng Q H, Xu K, Duan Y H. Spatiotemporal regulation of circular RNA expression during liver development of Chinese indigenous Ningxiang pigs [J]. *Genes*, 2022, 13(5): 746
- [25] Li Y J, Song Y F, Zhao M, Guo Y J, Yu C X, Chen W B, Shao S S, Xu C, Zhou X L, Zhao L F, Zhang Z H, Bo T, Xia Y, Proud C G, Wang X M, Wang L, Zhao J J, Gao L. A novel role for *CRTC2* in hepatic cholesterol synthesis through SREBP-2[J]. *Hepatology*, 2017, 66(2): 481-497
- [26] Han H S, Kim S G, Kim Y S, Jang S H, Kwon Y, Choi D, Huh T, Moon E, Ahn E, Seong J K, Kweon H S, Hwang G S, Lee D H, Cho K W, Koo S H. A novel role of CRTC2 in promoting nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Molecular Metabolism*, 2022, 55: 101402
- [27] Shaw R J, Lamia K A, Vasquez D, Koo S H, Bardeesy N, Depinho R A, Montminy M, Cantley L C. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin [J]. *Science*, 2005, 310(5754): 1642-1646
- [28] Lizcano J M, Göransson O, Toth R, Deak M, Morrice N A, Boudeau J, Hawley S A, Udd L, Mäkelä T P, Hardie D G, Alessi D R. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1[J]. *The EMBO Journal*, 2004, 23(4): 833-843
- [29] Patel K, Foretz M, Marion A, Campbell D G, Gourlay R, Boudaba N, Tournier E, Titchenell P, Peggie M, Deak M, Wan M, Kaestner K H, Göransson O, Viollet B, Gray N S, Birnbaum M J, Sutherland C, Sakamoto K. The LKB1-salt-inducible kinase pathway functions as a key gluconeogenic suppressor in the liver [J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4535

责任编辑: 秦梅



第一作者简介:王冰洁,在读硕士研究生。2023年获得校级一等学业奖学金、优秀研究生干部等荣誉,主要从事动物遗传育种与繁殖等研究。



通讯作者简介:韩雪蕾,博士,教授,硕士生导师,主要从事动物遗传育种与繁殖研究,中国畜牧兽医学会养猪学分会理事,中国畜牧兽医学会畜禽遗传标记学分会理事;主持或参与项目30余项,包括国家自然科学基金项目、国家重点研发计划、农业农村部生物育种等。以第一作者和通讯作者发表学术论文40余篇,主/参编教材与专著6部,授权专利9项,以主要完成人获河南省科技进步奖3项。