

小鼠和鸡的类 E1 酶新基因 UBAL 的克隆和表达分析*

薛 鹏^{1,2)**} 慈宏亮^{1,3)**} 陈 微⁴⁾ 李亦平^{1,3,4)***}

¹⁾北京师范大学生命科学院生物医学研究所, 北京 100875;

²⁾中国科学院生物物理研究所蛋白质组平台, 北京 100101;

³⁾浙江赛尔生物医学研究院, 杭州 310006;

⁴⁾ Forsyth Institute, Harvard School of Dental Medicine, Boston 02115, USA)

摘要 根据含有 UBA_NAD binding domain 的 EST 序列, 利用同源性序列查找和 EST 拼接的方法, 克隆得到鼠、鸡的新基因 UBAL (ubiquitin-activating enzyme like protein), 它们都具有泛素活化酶 Uba1 的保守结构域 I, 可能的 ATP 结合序列 GVGGVG 和 Cys 活性位点. 用半定量 RT-PCR 分析 11 种成年小鼠组织的 mUBAL 表达量, 显示 mUBAL 在成年小鼠多种组织中都有表达, 在肾、睾丸、脑、心脏中尤为丰富. 用 mUBAL 的编码区为探针进行的小鼠胚胎整体原位杂交显示, mUBAL 在胚胎发育早期即开始表达, 并随着前内脏内胚层 (AVE) 的向前迁移而迁移, 随后在胚胎的端脑区特异性表达. 与小鼠胚胎的表达谱相类似, gUBAL 在 HH14、HH16 和 HH18 期鸡胚中的表达主要集中在头部. 根据 mUBAL 和 gUBAL 的序列相似性保守结构域和活性位点, 可以初步断定它们可能是类泛素活化酶 E1 的新成员, 可能通过活化类泛素蛋白参与胚胎脑部的发育和调控成体组织的功能.

关键词 类泛素蛋白, 类泛素蛋白活化酶 (UBAL), 克隆, 表达谱

学科分类号 Q785, Q786

蛋白质的翻译后修饰对于蛋白质功能的调节和遗传信息的扩展有重要的作用, 这种修饰既包括蛋白质的小分子修饰, 如磷酸化, 乙酰化, 也包括另一类重要的蛋白质翻译后修饰是大分子的蛋白质对蛋白质的共价修饰, 它们在蛋白质调节方面的作用越来越受到人们的关注. 第一个被发现的蛋白质对蛋白质的翻译后修饰是泛素化, 在蛋白质的泛素化修饰过程中, 蛋白质与一个或者多个分子的 76 氨基酸残基的泛素共价结合, 与蛋白质结合的泛素作为信号控制着细胞多种功能. 近年来, SUMO, NEDD8, AGP12, UCRP/ ISG15 等一系列修饰蛋白——类泛素蛋白 (ubiquitin-like proteins, UBLs) 相继被发现, 它们与泛素的同源性虽然不高, 但却有着非常相似的蛋白质修饰过程^[1]. 泛素和 UBLs 与被修饰的目的蛋白的连接过程主要涉及三类酶的参与, 分别是活化酶 E1 (activating enzyme), 结合酶 E2 (conjugation enzyme), 连接酶 E3 (ligase)^[2]. 首先, E1 酶通过水解 ATP 将其活性位置的半胱氨酸残基

与泛素活性 Gly 的羧基端形成高能硫酯键从而激活泛素; 而后, 活化的泛素被转移到结合酶 E2, 并通过高能硫酯键与之结合. 某些情况下, E2 可以直接使泛素与目的蛋白结合, 但通常是泛素与目的蛋白结合是需要 E3 的参与, E3 酶主要起识别底物蛋白, 使底物蛋白发生选择性泛素化的作用.

我们在用电子克隆方法寻找新基因工作中, 发现了一种新的类 E1 酶 UBAL (ubiquitin-activating enzyme like protein), 并克隆了小鼠和鸡的 UBAL——mUBAL 和 gUBAL, 该基因在多种物种之中具有高度的保守性, 提示 UBAL 具有重要的功能. UBAL 的基因序列与其他 E1 酶类的序列相似度虽不高却具有相同的结构域, 并且具有保守的

*浙江赛尔生物医学研究院资助项目.

**薛鹏和慈宏亮为并列第一作者.

*** 通讯联系人. Tel: 010-58806656, E-mail: YPLi@forsyth.org

收稿日期: 2005-11-11, 接受日期: 2005-12-29

ATP结合位点和 Cys 功能氨基酸. UBAL 与最近报道的类泛素蛋白 Ufm1 的 E1 酶 Uba5 为同源蛋白^[3], 我们的研究发现, UBAL 在成年小鼠各组织的表达丰度各不相同, 在肾、睾丸、脑、心脏中尤为丰富. UBAL 在小鼠胚胎和鸡胚头部的特异性表达提示, UBAL 可能在胚胎头部发育中发挥重要的作用.

1 材料和方法

1.1 材料

健康小鼠购于北京大学医学部实验动物中心, 受精鸡卵购于当地种蛋供应厂. Trizol 购于北京鼎国生物技术有限责任公司; M-MLV 逆转录酶购于 Invitrogen 公司; DNA 聚合酶购于宝生物工程大连有限公司; 地高辛标记与检测试剂盒购自罗氏 (Roche) 公司; 所有引物均由北京博润公司合成; QIAquick Gel Extraction Kit 购于 QIAGEN 公司; pBluescript SK(+) 载体为北京师范大学生物医学研究所保存; 其他试剂均为国产分析纯产品.

1.2 方法

1.2.1 小鼠和鸡 UBAL 基因 CDS 的克隆.

根据 RIKEN 公布的含有 “UBA_NAD binding domain” 的小鼠新基因 AK017787 设计引物, 上游引物为: 5' TA gga tcc ATG GCC GAC TCG GTG 3' 含 *Bam*H I 酶切位点, 下游引物为: 5' GCC ggt acc TAC ATA TTC TTC ATC CTG 3' 含 *Kpn* I 酶切位点, 预期扩增产物长度 1 228 bp. 以 E11.5 鼠胚胎总 RNA 逆转录合成 cDNA 为模板, 50 μ l 体系, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C, 3min, 94 $^{\circ}$ C, 1min, 55 $^{\circ}$ C, 1 min, 72 $^{\circ}$ C, 2 min, 经过 35 次循环后, 于 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 终产物克隆到 pBluescript SK(+) 载体上并测序.

鸡 gUBAL cDNA 的克隆根据小鼠同源序列比对的方法搜寻鸡 EST 库和基因组, 再根据 EST 拼接和基因组序列比对的方法预测结果设计引物, 上游引物为: 5' TAGgatccATGCGCGAGCGGG-TGGAGC 3', 含 *Bam*H I 酶切位点, 下游引物为: 5' TCcccggg TGCTACAAGTTGCGCATTT 3', 含 *Sma* I 酶切位点, 预期扩增产物长度 1 196 bp. 以鸡胚的逆转录 cDNA 为模板, 50 μ l 体系, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C, 1 min, 57 $^{\circ}$ C, 1 min, 72 $^{\circ}$ C, 2 min, 经过 35 次循环后, 于 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 将 PCR 产物用 *Bam*H I 和 *Sma* I 酶切后, 连于 pBluescript SK(+) 载体上并测序.

1.2.2 半定量 RT-PCR. 根据小鼠 UBAL 序列测序的结果, 设计位于跨多个外显子特异性高的 PCR 引物, 上游引物: 5' CTGGAGAGTCGGCTTTGTTC 3', 下游引物: 5' CCTCAGACACCAGCTCAATG 3', 预期扩增产物 387 bp, 退火温度为 53 $^{\circ}$ C, 35 个循环. 选用看家基因 GAPDH 作为内参照, 上游引物: 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3', 下游引物: 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3', 预期扩增产物 452 bp, 以成年小鼠各组织提取的总 RNA 逆转录的 cDNA 为模板, 采用 25 μ l 体系, 退火温度为 58 $^{\circ}$ C, 30 个循环, PCR 结果用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 半定量分析 (目的基因片段和 GAPDH 产物电泳上样量一致).

1.2.3 原位杂交. 原位杂交参照文献[4]的方法, 以小鼠或鸡 UBAL 编码区的 cDNA 为模板, 用 DIG 核酸标记试剂盒制备 DIG 标记的 RNA 探针, 分别与各期小鼠胚胎和鸡胚进行胚胎的整体原位杂交.

2 结 果

2.1 小鼠和鸡的 UBAL 的克隆

mUBAL 基因以小鼠胚胎逆转录的 cDNA 为模板, 获得一条 1.2 kb 的片段 (图 1a), 将该片段克隆到 pBluescript sk⁺ 载体上, 测序表明与 AK017787 的 171~1 398 bp 完全一致.

为了克隆鸡 gUBAL, 我们用 mUBAL cDNA 编码区序列与鸡的 cDNA 数据库进行 Blast 分析, 没有发现同源序列, 再与鸡 EST 数据库进行 Blast 分析, 共得到 5 个 EST 序列, 分别为 BU388768, BU270390, BU422109, BU367611, BU330263, 用 5' 端最长的 BU388768 和 3' 端最长的 BU478606 分别 Blast 分析, 又得到两条 EST, 为 BQ037401

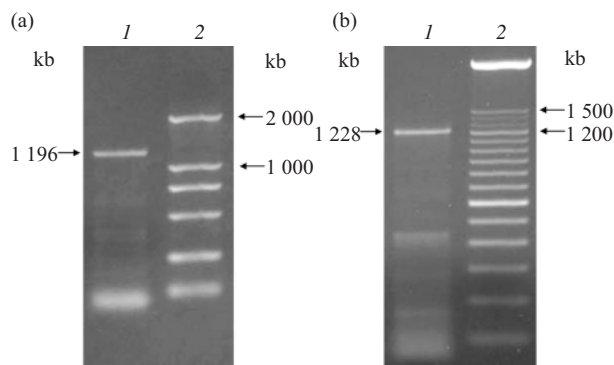


Fig. 1 The cloning of the UBAL gene by RT-PCR

(a) Amplification product of gallus gUBAL gene. 1: PCR product; 2: DNA marker(DL2000). (b) Amplification product of mUBAL gene. 1: PCR product; 2: DNA marker(100bp plus).

和 BU478606. 将这 7 条 EST 用 ContigExpress 拼接得到 gUBAL 的预测序列, 并根据该序列设计了引物. 以鸡胚逆转录的 cDNA 为模板, RT-PCR 获得一条 1.2 kb 左右的片段(图 1b), 测序后向 NCBI 提交了 gUBAL 序列, GenBank 登录号为 AY620963.

2.2 UBAL 蛋白序列分析

用 ClustalW 程序对 Uba5, mUBAL 和 gUBAL 的蛋白质序列对比, 发现 hUBAL 与 mUBAL 和 gUBAL 的一致性分别为 86.4% 和 83.7%. mUBAL

和 gUBAL 都具有可能的 ATP 结合位点 GVGGVG, mUBAL 和 gUBAL 可能的活化 Cys 分别位于 249 和 244 (图 2).

根据 Komatsu 等^[9]的方法, 泛素 E1 活化酶 Uba1 包含有 6 个保守的结构域, 分别为结构域 I, I b, II, III, IV 和 V. 通过序列比对和保守结构域分析发现, mUBAL 与 gUBAL 也含有保守结构域 I (图 3), 并且含有 ATP 结合位点序列 GXGXXG 和 E1 酶类所必需的 Cys 残基.



Fig. 2 Sequence alignment of hUBAL, mUBAL and gUBAL

The amino-acid sequences of UBAL are compared by the ClustalW program. Open box indicates an ATP-binding motif.

The putative active site Cys residue is boxed in black. The metal-binding motif is underlined.

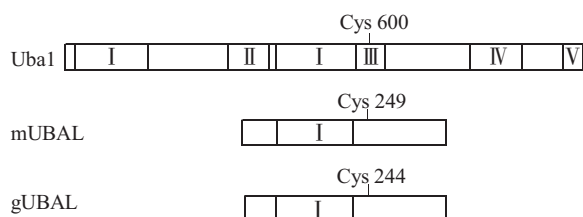


Fig. 3 Domain structure of the E1 enzymes

Uba1 is divided into several domains, including I, II, III, IV and V boxes, which are conserved in other E1-like enzymes, and other regions without obvious similarity. mUBAL and gUBAL contains the box I and two other parts. The box I region includes the conserved ATP binding motif (GXGXXG). The putative active site Cys residues are indicated.

2.3 mUBAL 在成年组织的表达谱分析

为了研究 UBAL 在成年小鼠中的表达分布, 我们用半定量 RT-PCR 分析了 11 种成年小鼠体内的 UBAL mRNA 表达, 结果显示, mUBAL 在多种成年小鼠组织中都有表达, 且表达丰度各不相同,

由强到弱依次为睾丸、肾、脑、心脏、肌肉、肠、肝、肺、小脑、子宫, 而在眼中没有检测到表达信号(图 4). 为了预测 UBAL 在人的成体组织中的表达, 我们用 UBAL 的 UniGene 号(Hs.170737)在 NIH 的肿瘤基因组解剖学工程 (The Cancer Genome

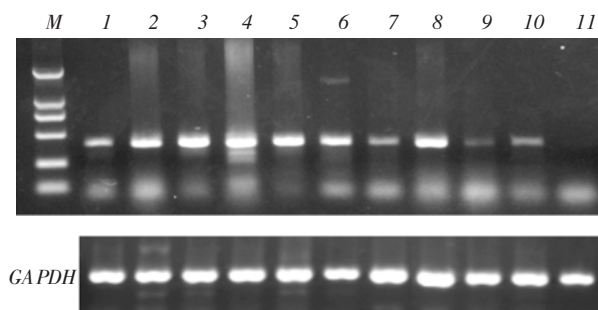


Fig. 4 RT-PCR analysis of mUBAL expression in adult mouse organs

1: Liver; 2: Intestine; 3: Kidney; 4: Testis; 5: Brain; 6: Skeletal muscle; 7: Lung; 8: Heart; 9: Uterus; 10: Cerebella; 11: Eye. M: Molecular mass marker. GAPDH was used to control for differences in loading.

Anatomy Project, CGAP) 的服务器进行虚拟 Northern 电子表达谱分析 (<http://cgap.nci.nih.gov/Genes>) 所得的结果, 与小鼠的半定量 RT-PCR 结果相似 (结果未显示), 在脑、肝、前列腺、肺等组织表达丰度较高, 值得注意的是, Uba5 还在胚胎和一些癌变组织中呈现高表达状况。

2.4 UBAL 胚胎原位杂交分析

根据虚拟 Northern 的结果, UBAL 在胚胎中的表达丰度明显高于其他组织. 为了验证这一结果我们用整体原位杂交的方法研究了 mUBAL 在小鼠胚胎和鸡胚胎中的表达. 用 mUBAL 的编码区序列探针进行的小鼠胚胎整体原位杂交显示, mUBAL 在原肠胚前期 (E6.0) 没有表达, 在前原条期 (E6.75) 胚胎偏离远端 (Distal) 箭头所指的部位开始出现微弱的表达 (图 5a), 到中原条期 (E7.25) mUBAL 的表达逐步向上延长并接近胚外组织 (图 5b). 头折期 (E7.5) 胚胎中, mUBAL 在前端头折处出现明显的表达 (图 5c). 在原肠胚的末期体节发生期的初期

(约 E8.25), 无论是胚外组织(图 5d)还是剥去胚外组织的侧面图(图 5e), 均可观察到头折处的表达, 而在胚外组织没有表达. 小鼠胚胎 10 体节期(E9.0), mUBAL 在端脑仍有明显的表达(图 5f). 小鼠胚胎 18 体节期 (约 E9.5) 中, 可以观察到 mUBAL 在端脑的特异表达 (图 5g 正面图, h 侧面图). 小鼠胚胎头部的发育是从体轴的建立开始的,随着早期胚胎体轴从远近轴 (D—P 轴) 向前后轴 (A—P 轴) 转化^[6], 在受精卵末期 (fertilization) 的远端 (distal) 内脏内胚层(VE)变为前内脏内胚层(anterior visceral endoderm, AVE), 并向侧面迁移增殖, 逐渐移向胚外组织区. 在原肠期 AVE 可以诱导外胚层 (epiblast) 表达形成前脑. 本实验中 UBAL 的胚胎表达模式, 早期在 AVE 附近有微弱的表达, 后期在头部有明显的表达, 与 Hex、Hesx1、Lim1、Otx2^[7-9]的早期表达模式非常相似, 这些基因都是在胚胎头部发育过程中重要的分子标记或调控基因。

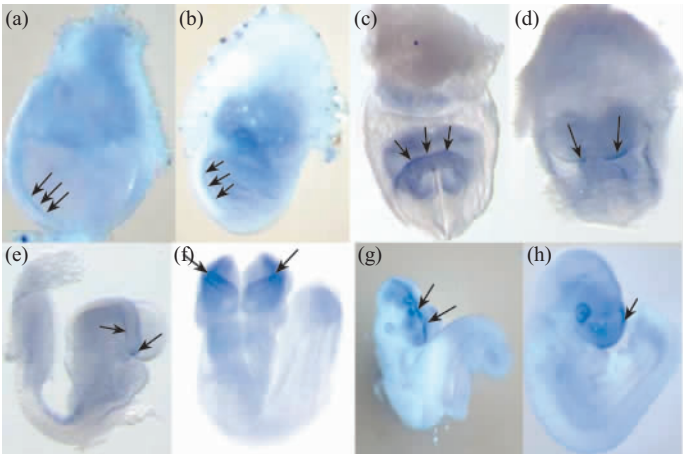


Fig. 5 Whole-mount *in situ* hybridization of mUBAL expression in gastrulation and somitogenesis stages
(a) Lateral view of mUBAL expression in early streak stage (E6.75) embryo. (b) Lateral view of mUBAL expression in Midstreak-stage (E7.25) embryo. (c) Anterior views of headfold stage (E7.5) embryo. (d) Anterior views of E8.25 embryo. (e) Lateral view E8.25 embryo. (f) Anterior view of a 10-somite-stage (E9.0) embryo. (g) Anterior view of 18-somite-stage embryo (E9.5). (h) Lateral view of E9.5 embryo. The black arrows show mUBAL expression.

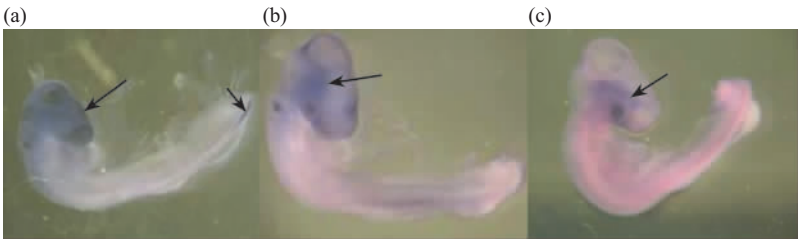


Fig. 6 Whole-mount *in situ* hybridization of chicken embryos
(a),(b),(c) Lateral view of gUBAL expression in HH14, HH 16 and HH 18 chicken embryos respectively.

为了研究 UBAL 在鸡胚中的表达谱, 我们用 gUBAL 的编码区序列为探针, 分析了 gUBAL 在 Hamburger-Hamilton(HH) 14, 16, 18 期鸡胚中的表达, 结果显示(图 6), gUBAL 主要在被研究的各期胚胎的头部出现表达, 在包括心脏、肢芽、翅芽在内的器官中没有表达, 这一结果与 UBAL 在小鼠胚胎中的表达结果相似. UBAL 在鸡胚中的表达谱进一步验证 UBAL 并不是广泛的表达, 而是特异表达于胚胎发育过程中的头部, 提示 UBAL 可能对头部的发育发挥一定的作用. 此外, HH14 (图 6a)中还在尾部有少量表达, 该部位也许是胚胎体节后 Hensen's node 到尾部之间的原条区, Hensen's node 做为鸡胚发育过程中一个重要的 Organizer 在体轴前后轴的后部建立起重要作用. 而在本研究中, 鼠胚相应发育时期的 node 区, 却没有检测到表达.

3 讨 论

通过同源序列分析和 EST 拼接, 我们预测并克隆了小鼠 mUBAL 基因和鸡的 gUBAL 基因, 它们与人类 UBAL 具有高度的同源性, 它们都包含类泛素活化酶 E1 的保守结构域 I (Thif 结构域), ATP 结合位点和保守的活化位点 Cys, Cys 可能与 Ufm1 形成高能硫酯键, 进而活化 UBLs. 根据 mUBAL 和 gUBAL 的保守结构域和活性位点, 我们推测小鼠 mUBAL 和鸡的 gUBAL 是类泛素活化酶 E1 的新成员.

泛素作为一个小的多肽分子, 选择性地连接和修饰在细胞内的靶蛋白上, 并介导靶蛋白与 26 S 蛋白酶体识别和降解. 泛素依赖的水解酶系统在细胞周期, 细胞信号传导, 免疫识别过程中发挥重要作用. 虽然 NEDD8/RUB、Sentrin/SUMO、Apg12/Apg8、Urm1 等 UBLs 家族蛋白, 对蛋白质转录后修饰与泛素依赖的水解途径不尽相同, 并且有着各自不同的生物学功能, 但是它们与靶蛋白的连接过程与蛋白质泛素化连接过程却非常相似^[10]. 特别是第一步类泛素活化酶 E1 对 UBLs 的活化, 与泛素的活化过程极为相似, 如 APPBP-UBA3 (ULA1-UBA3) 对 SUMO/Sentrin, AOS1-UBA2 对 NEDD8/RUB, Apg7 对 Apg12/Apg8, UBA4 对 Urm1 等, 其基本过程都是 E1 水解 ATP, 使 UBLs C 端腺苷化, 形成中间物 UBL-AMP, 同时释放出焦磷酸, 接着这个活化的 UBL-AMP 中间物传递到 E1 的一个活化位点 Cys 上, 通过高能硫酯键形成

E1-UBL 复合物^[11]. 类 E1 酶通常与 E1 酶(Uba1)具有相似的结构域, 如 Uba2 和 Uba3 与 Uba1 的 C 端具有较高的同源性, 包含保守结构域 I, III 和 IV, 而 Uba4 和 UBAL 则相对较小, 仅包括保守结构域 I 即 Thif 结构域. 在本研究中发现, mUBAL 和 gUBAL 与其他 E1 酶相似也具有 Thif 结构域, 并且包含 Thif 结构域中的 ATP 结合位点 GXGXXG, 在其 249 和 244 的位置还发现了活化酶必需的 Cys 位点.

UBAL 基因在多种器官中广谱表达, 包括胎盘、结肠、胃、心脏、脑、肝、肾, 脾和骨骼肌等^[12], 最近的研究发现, 一个新的类 E1 酶 *nUBE1L* 特异性在睾丸中表达, 提示该基因与精子的形成和雄性的生殖有一定的关系^[13]. 我们的研究发现, mUBAL 在成体小鼠中的表达并不均一, 在肾、睾丸、脑、心脏中尤为丰富, 这提示 UBAL 对类泛素蛋白的活化与泛素活化的组织部位不同具有一定的特异性, 仅能在一定的器官中发生.

UBAL 在小鼠和鸡胚胎发育时头部特异性表达, 此外, 斑马鱼信息网(<http://zfinfo.org/cgi-bin>)还提供了 UBAL 斑马鱼的 EST: ZDB-PUB-010810-1 在胚胎发生中的表达谱, 与鼠和鸡的表达结果极为相似, 胚胎初期在头部明显表达. 一些其他的类泛素蛋白转录后修饰过程与胚胎神经系统发育密切相关, NEDD8 一种新的 mRNA 最初发现在胎鼠的脑中富集, 随着鼠胚胎发育过程中表达量逐渐减弱, 成体组织中在心脏和骨骼肌中 NEDD8 限制表达^[14]. NEDD8 活化酶包含两个亚基, APP-BP1 和 UBA3^[15], UBA3 与 E1 酶的 C 端同源, 并且包含活性的半胱氨酸残基, 可以和 NEDD8 形成高能硫酯键. NEDD8 或 UBA3 基因敲除的老鼠在胚胎着床前期死亡于子宫, 由于胚胎的内细胞团细胞选择性的凋亡, 变异的滋养层细胞并不能进入到核内复制的 S 期. 我们的研究表明, UBAL 在胚胎中的表达含量高, 表达起始于胚胎发育早期原肠期前, 与头部的形成密切相关, 并且随着头部的形成表达逐步显著, 暗示 UBAL 作为一种假想的蛋白质转录后修饰途径的腺苷酸化酶, 也许在调节头部形成信号通路中有重要作用.

参 考 文 献

- 1 Pickart C M. Mechanisms underlying ubiquitination. Annual Review of Biochemistry, 2001, **70**: 503~533
- 2 Hochstrasser M. Biochemistry. All in the ubiquitin family. Science, 2000, **289** (5479): 563~564

- 3 Komatsu M, Chiba T, Tatsumi K, *et al.* A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier. *EMBO J*, 2004, **23** (9): 1977~1986
- 4 Stern C D, Holland P. *Essential Development Biology: A Practical Approach*. Oxford, UK: IRL Press, 1993. 257~274
- 5 Komatsu M, Tanida I, Ueno T, *et al.* The C-terminal region of an Apg7p/Cvt2p is required for homodimerization and is essential for its E1 activity and E1-E2 complex formation. *J Biol Chem*, 2001, **276** (13): 9846~9854.
- 6 Beddington R S P, Robertson E J. Axis development and early review asymmetry in mammals. *Cell*, 1999, **96** (2): 195~209
- 7 Thomas P Q, Brown A, Beddington R S P. Hex: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors. *Development*, 1998, **125** (1): 85~94
- 8 Martinez-Barbera J P, Beddington R S. Getting your head around Hex and Hesx1: forebrain formation in mouse. *Int J Dev Biol*, 2001, **45** (1): 327~36
- 9 Beddington R S P, Robertson E J. Anterior patterning in mouse. *Trends in Genetics*, 1998, **14** (7): 277~284
- 10 Hochstrasser M. Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. 2000, **2** (8): E153~E157
- 11 Pickart C M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 2001, **70**: 503~533
- 12 Handley P M, Mueckler M, Siegel N R, *et al.* Molecular cloning, sequence, and tissue distribution of the human ubiquitin-activating enzyme E1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (1): 258~262
- 13 Zhu H, Zhou Z M, Huo R, *et al.* Identification and characteristics of a novel E1 like gene nUBE1L in human testis. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2004, **36** (3): 227~234
- 14 Kamitani T, Kito K, Nguyen H P, *et al.* Characterization of NEDD8, a developmentally down-regulated ubiquitin-like protein. *J Biol Chem*, 1997, **272** (45): 28557~28562
- 15 Osaka F, Kawasaki H, Aida N, *et al.* A new NEDD8-ligating system for cullin-4A. *Genes Dev*, 1998, **12** (15): 2263~2268

Molecular Cloning and Expression Analysis of a Novel E1 Like Gene UBAL in Mouse and Chicken*

XUE Peng^{1,2)*}, CI Hong-Liang^{1,3)*}, CHEN Wei⁴⁾, LI Yi-Ping^{1,3,4)***}

⁽¹⁾Biomedical Research Institute, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;

⁽²⁾Proteomic Platform, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁽³⁾Zhejiang Cell Biomedical Research College, Hangzhou 310006, China;

⁽⁴⁾Forsyth Institute, Harvard School of Dental Medicine, Boston 02115, USA)

Abstract According the EST sequence contained a UBA_NAD binding domain, a novel gene UBAL (ubiquitin-activating enzyme like protein) was cloning both in mouse and chicken by the homology scanning and EST splicing methods. UBAL contains the conserved domain I of Uba1, ATP binding motif and putative active site Cys. The expression profile of mUBAL was detected in most of the tissues of the 11 investigated tissues, especially in kidney, testis, brain and heart. Whole-mount *in situ* hybridization with the coding region of mUBAL showed that expression of mUBAL was presented in the early streak stage of mouse embryo and migrated anterior with anterior visceral endoderm (AVE) and then in the telencephalon. The gUBAL expression was also found in the brain of HH14, HH 16 and HH18 chick embryos. The conserved structures and expression patterns of UBAL suggested that UBAL may play important roles in the developing brain of embryo and adult tissues as E1 like enzyme.

Key words ubiquitin-like proteins, ubiquitin-activating enzyme like protein, cloning, expression profile

*This work was supported by a grant from Zhejiang Cell Biomedical Research College.

**Xue Peng and Ci Hong-Liang contributed equally.

***Corresponding author . Tel: 86-10-58806656, E-mail: YPLi@forsyth.org

Received: November 11, 2005 Accepted: December 29, 2005