

# 人脂素基因 *LIPIN1* 在酵母中的异源表达及细胞功能分析

房志家<sup>1</sup> 杜秀秀<sup>1</sup> 黄志伟<sup>1\*</sup> 王松<sup>2</sup> 史萍<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>东华大学化学化工与生物工程学院, 上海 201620; <sup>2</sup>华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

**摘要** 脂类代谢调控是维持生物体能量平衡的重要环节, 脂类代谢调控的紊乱与肥胖症、糖尿病和高血压等疾病密切相关。脂素基因 *LIPIN1* 是诱导脂肪细胞分化、调控脂类合成的关键基因, 其编码的磷脂磷酸酶(phosphatidate phosphatase, PAP)在人体三酰甘油合成中起关键作用, 是维持人体脂类平衡的重要保障。此外, 该基因还作为重要的转录辅激活因子参与多种生长及营养代谢调控。多种生物中均有类似功能的基因被发现, 暗示了其功能的多样性及物种间的保守性。该文利用酿酒酵母在脂类代谢研究中性状易于表征、同源基因 *PAH1* 功能明确的优势, 通过同源重组技术构建脂素缺陷型酵母, 探索脂素基因在维持酵母正常生长及脂类合成中的重要作用, 并通过功能互补及生物信息学技术对比分析了人源 *LIPIN1* 基因与酵母 *PAH1* 基因编码蛋白在结构和功能上的保守性, 为脂素基因 *LIPIN1* 的细胞功能研究提供基础数据。

**关键词** 脂素基因; *PAH1*; *LIPIN1*; 磷脂磷酸酶; 酵母

## Expression of Human *LIPIN1* Gene and Its Functional Analysis in Yeast

Fang Zhijia<sup>1</sup>, Du Xiuxiu<sup>1</sup>, Huang Zhiwei<sup>1\*</sup>, Wang Song<sup>2</sup>, Shi Ping<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China;

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract** The regulation of lipid metabolism is important in maintaining the energy balance. Its disorder induces many diseases, such as obesity, diabetes, high blood pressure and so on. *LIPIN1*, a key gene for adipocyte differentiation induction and lipids synthesis regulation, encodes phospholipids phosphatase (PAP) and plays an important role in triglyceride synthesis and lipids homeostasis in human. In addition, *LIPIN1* acts as a transcriptional coactivator in various regulations of nutrition and growth metabolism, and many similar genes have been found in other species, indicating its various functions and species conservation. In this paper, we constructed *PAH1* mutant yeast and transformed it with human *LIPIN1* to study effects of *LIPIN1* on yeast growth and lipid synthesis based on the convenience of *Saccharomyces cerevisiae* in lipid metabolism study and phenotypic observation, and the clarity of cellular function of *PAH1*. Thereafter, we compared *LIPIN1p* with *PAH1p* in structure and function via functional complementation analysis and bioinformatics, and confirmed the functional conservation of PAP in human and yeast. This work will provide evidence for the cellular function study of *LIPIN1*.

**Key words** lipin gene; *PAH1*; *LIPIN1*; phospholipids phosphatase; yeast

收稿日期: 2013-10-29 接受日期: 2014-01-22

国家自然科学基金(批准号: 31100549)、中央高校基本科研业务费专项资金(批准号: 2232014A3-03)和国家重点实验室专项经费(批准号: 2060204)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-67792911, E-mail: zhiwei@dhpu.edu.cn; Tel: 021-64251655, E-mail: ship@ecust.edu.cn

Received: October 29, 2013 Accepted: January 22, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31100549), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No.2232014A3-03) and the National Special Fund for State Key Laboratory of Bioreactor Engineering (Grant No.2060204)

\*Corresponding authors. Tel: +86-21-67792911, E-mail: zhiwei@dhpu.edu.cn; Tel: +86-21-64251655, E-mail: ship@ecust.edu.cn

网络出版时间: 2014-04-29 15:39 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.05.0353.html>

以三酰甘油为主的中性脂肪是维持生物体能量平衡的重要环节,这一环节的调节失衡是诱发肥胖、产生高血压、糖尿病及其他心脑血管疾病的主要原因<sup>[1-3]</sup>。与之密切相关的脂素基因LIPINI于2001年在脂肪肝不良小鼠(fatty liver dystrophy, *fld*)研究中被发现<sup>[4]</sup>,并在后来的脂类代谢研究中被证实是影响体内脂肪代谢的关键基因<sup>[5-6]</sup>。该基因的突变是引发人体脂肪代谢功能紊乱,产生肥胖的重要诱因<sup>[7]</sup>。这一重要发现立即引起了人们的关注。通过近年来深入的探索研究发现,一方面,脂素基因LIPINI通过编码磷脂磷酸酶(phosphatidate phosphatase, PAP)调节体内的三酰甘油的合成<sup>[8]</sup>,来维持人体的脂类代谢平衡<sup>[3]</sup>。三酰甘油合成底物磷脂酸(phosphatidic acid, PA)在PAP的作用下,脱去磷酸基团形成二酰甘油<sup>[9-10]</sup>。最终在脂酰基转移酶的作用下形成三酰甘油<sup>[8,11]</sup>。另一方面,LIPINI所编码的PAP还作为重要的转录辅激活因子参与多种脂质代谢相关调控,与其他重要的调节因子共同调节脂肪代谢相关基因的表达<sup>[6]</sup>、诱导脂肪细胞分化<sup>[12]</sup>,同时还可能参与了人体抵抗脂毒、改善胰岛素敏感等调控<sup>[6]</sup>。但局限于哺乳动物的多细胞,多基因及多层次调控网络的复杂性,许多未知的功能难以揭示,而以基因功能明确的模式生物作为基因功能探索的平台则有更直接的优势。

2006年,Han等<sup>[8]</sup>在酿酒酵母中发现,*PAHI*基因与人类LIPINI基因有着较高的相似度。其所编码的PAP同样能够催化PA进行脱磷酸化,形成二酰甘油<sup>[13-14]</sup>,调节三酰甘油的合成<sup>[8,11]</sup>,并能够在Zn的介导调控下影响酵母细胞内的脂代谢平衡<sup>[8,15-16]</sup>。除此之外,在近几年的研究中还发现,*PAHI*在维持酵母正常生长及营养代谢平衡中发挥重要作用<sup>[17-23]</sup>,如抵抗脂毒胁迫<sup>[19]</sup>、维持线粒体呼吸作用<sup>[17]</sup>、调节脂类合成及脂滴形成等<sup>[20,24]</sup>。本文通过构建*PAHI*突变酵母,分析*PAHI*突变表型,同时将LIPINI在*PAHI*缺陷型酵母中异源表达,通过功能互补分析进一步探索出人源LIPINI与酵母*PAHI*之间在抗脂毒胁迫等方面同样具有功能保守性,并结合生物信息学技术探讨了两者结构的相似性及氨基序列的保守性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

工具酶Bam HI、Hind III、Not I、Pst I、Kpn I均购于大连 TaKaRa公司;Taq酶、Pfu酶、dNTP mix、

10×buffer(MgCl<sub>2</sub>)、10×buffer(MgSO<sub>2</sub>)、T<sub>4</sub>连接酶及缓冲液均购于上海生工生物工程有限公司;Lyticase(粉末)购于Sigma公司;油红O粉末、油酸、油酸钠、吐温-80购于国药试剂。实验所用酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae* BY4742α、所用质粒YCplac33(*ura3<sup>+</sup> Ap<sup>r</sup> ori*)、YEplac195(*ura3<sup>+</sup> Ap<sup>r</sup> ori*)由本实验室提供。YEP51-LIPINI(*leu2<sup>+</sup> Km<sup>r</sup> ori*)由Dr. Elpeleg馈赠。实验所用仪器Bio-Rad gene pulse xcell、Bio-Rad 2 mm CUP购于Bio-Rad(中国)公司;PCR ABI 2720购于ABI公司;Tanon-3500凝胶成像系统购于上海天能科技有限公司。实验所用的酵母基因组提取试剂盒购于天根生物科技有限公司;大肠杆菌质粒提取试剂盒购于Biomiga公司;凝胶DNA回收试剂盒购于上海捷瑞公司。25 mm×8 mm薄层层析硅胶板HSGF-254购于烟台江友硅胶开发有限公司。0.5 mm×100 mm点样毛细管购于上海欣鹏玻璃仪器有限公司;0.5 mm玻璃珠购于海德创业北京生物公司。

### 1.2 培养基

酵母菌尿嘧啶合成缺陷型培养基(synthetic complete medium lacking uracil, SC-Ura):无氨基酵母氮源基(yeast nitrogen base without amino acids, YNB) 1.7 g/L、谷氨酸(glutamic acid) 1.2 g/L、尿嘧啶营养缺陷混合物(drop-out mix) 2.0 g/L、葡萄糖 20.0 g/L。甘油为碳源的合成培养基:YNB 1.7 g/L、Glutamic Acid 1.2 g/L、Drop-out Mix 2.0 g/L、甘油 20.0 g/L。油酸培养基:YNB 1.7 g/L、Glutamic Acid 1.2 g/L、Drop-out Mix 2.0 g/L、葡萄糖 20.0 g/L、油酸 1.0 mmol/L、DMSO 1.4%。

### 1.3 实验方法

1.3.1 酵母*PAHI*基因突变体的构建 根据文献[25]中所设计的PRS系列质粒筛选标记基因扩增所用的序列及*PAHI*基因两端序列,设计如下引物:OH30: 5'-GGG AAG AAA TTA CTG AAG ATA GAC ACA TCG GTC GAT TAT GCA GAT TGT ACT GAG AGT GCA C-3'; OH31: 5'-TAT GCA GTA TGG ATC GTT ATA AAT AAT ATT CGG CTA CAA GAA TCT GTG CGG TAT TTC ACA CCG-3'。以PRS400质粒作为模板,扩增出含*KanMX4*筛选标记基因及融合*PAHI*两端同源臂的DNA片段,进行*PAHI*敲除。

1.3.2 酵母*PAHI*高表达载体的构建 *PAHI*高表达载体YEplac195-PAHI依据参考文献[26-27]进行构建。依据*Saccharomyces* Genome Database数据库中登记的

*S. cerevisiae* 2888C *PAH1*相关基因序列,分别在*PAH1*上游501 bp处、32 bp处以及*PAH1*下游68 bp处、642 bp处设计如下引物: OH21 5'-CGG GAT CCG TTC GCA GTT CCT AAC ACT G-3'; OH22 5'-ATA AGA ATG CGG CCG CTA TCT TCA GTA ATT TCT TCC-3'; OH23 5'-ATA AGA ATG CGG CCG CGA TCC ATA CTG CAT ATT AA-3'; OH24 5'-ACG CCA AGC TTG GGC GTA CAA TAA TTG CTT-3'。以酵母基因组为模板,用引物OH21、OH22和引物OH23、OH24,分别扩增出*PAH1*基因两端的同源臂片段PAH1-promoter、PAH1-terminator,各400 bp、600 bp左右。然后分别以*Bam*H I、*Not* I酶切PAH1-promoter,以*Hind* III、*Not* I酶切PAH1-terminator,以*Bam*H I、*Hind* III酶切YEplac195质粒。经过T<sub>4</sub>连接酶连接反应,形成质粒YEplac195-PAH1,转入大肠杆菌DH5 $\alpha$ 后用含氨苄青霉素的LB平板挑选阳性克隆。

**1.3.3 人源脂素基因LIPIN1酵母中异源表达质粒的构建** 首先构建携带有酵母能够识别强启动子ADH1p的高表达质粒YEplac195-ADH1p,然后根据YEP51-LIPIN1测序结果,分别在LIPIN1起始密码子处和终止密码子处设计如下引物: HO66: 5'-GCT CTA GAC GAG ATG AAT TAC GTG GGG CAG-3'; HO67: 5'-GGG GTA CCG GAT CTT TAC GCT GAG GC-3'。以获赠质粒YEP51-LIPIN1为模板,用引物HO66、HO67扩增出LIPIN1基因,大小约为2 700 bp。然后以*Xba* I、*Kpn* I酶切扩增产物及YEplac195-ADH1p。经过T<sub>4</sub>连接酶连接反应,形成质粒YEplac195-ADH1p-LIPIN1,转入大肠杆菌DH5 $\alpha$ 后用含氨苄青霉素的LB平板挑选阳性克隆。

**1.3.4 缺陷表型观察及功能互补分析** 根据文献[15,28-29]所采用的方法进行酵母脂毒性、温度敏感性、碳源利用率及脂肪合成等表型观察。(1)脂毒性检测:取约 $1 \times 10^7$ 酵母细胞( $D_{600} \approx 1$ ),10倍比进行梯度稀释后(稀释5个梯度),每个浓度梯度取5  $\mu$ L稀释后的菌液,滴在油酸培养基中,30  $^{\circ}$ C培养,以不含油酸的培养基作为对照。(2)温度敏感性检测:取约 $1 \times 10^7$ 酵母细胞,10倍比进行梯度稀释后(稀释5个梯度),每个浓度梯度取5  $\mu$ L稀释后的菌液,滴在SC培养基中,37  $^{\circ}$ C培养,以30  $^{\circ}$ C培养的菌作为对照。(3)碳源利用率检测:取约 $1 \times 10^7$ 的酵母细胞,10倍比进行梯度稀释后(稀释5个梯度),每个浓度梯度取5  $\mu$ L稀释后的菌液,滴在以甘油作为碳源的培养基中,30  $^{\circ}$ C

培养,以葡萄糖作为碳源的培养基作为对照。(4)脂水平分析:根据参考文献[30-31]提取酵母总脂,取平稳期酵母细胞约 $7 \times 10^8$  ( $D_{600} \approx 70$ ),进行酵母总脂提取,提取到的总脂用30  $\mu$ L甲醇/氯仿混合液(V/V, 2:1)进行溶解。根据参考文献[32],利用薄层层析法检测酵母菌株三酰甘油含量,所用扩展体系为正己烷/乙醚/甲酸=80:20:2(V/V/V),染色剂为碘蒸气。

**1.3.5 显微观察** 根据文献[20,33]所采用的方法进行酵母脂滴油红O染色及显微观察。取对数生长期的酵母细胞进行油红O染色(油红O工作液:3份的1%的油红O异丙醇储液与2份的双蒸水混合),室温下染色10 min,然后用50%异丙醇洗脱1次,双蒸水洗脱1次。将染色后的酵母细胞置于载玻片上,显微观察。

**1.3.6 生物信息学分析** 针对来源于酿酒酵母与现代人的PAP,应用BLASTX、Bioedit和ClustalX等生物信息学软件进行比较分析<sup>[34]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 酵母PAH1突变体的构建和脂素基因的克隆构建

利用PCR扩增技术获取含有PAH1双侧同源臂及*KanMX4*筛选标记基因的融合DNA片段,片段大小与理论值一致,约1 500 bp,电泳结果如图1A所示。利用酵母电转化技术,将融合DNA片段转入酿酒酵母中。挑取能在含G418的酵母浸出粉葡萄糖培养基(yeast extract peptone dextrose medium, YPD)中生长的酵母单克隆进行菌落PCR鉴定,共筛选到PAH1双侧臂均发生正确同源重组的酵母克隆1个,电泳结果如图1B所示。

利用PCR扩增技术获取含有PAH1双侧同源臂,分别扩增出PAH1基因两端的同源臂片段PAH1-promoter、PAH1-terminator,片段大小均与理论值一致,电泳结果如图1C所示;再利用gap-repair技术<sup>[26]</sup>构建YEplac195-PAH1高表达载体,首先采用酵母质粒提取方法将获取重组质粒,将获取到的重组质粒转入大肠杆菌感受态DH5 $\alpha$ 中,然后采用菌落PCR方法筛选出具有PAH1表达质粒的细胞克隆5个,菌落PCR的电泳结果如图1D所示。

人源LIPIN1的亚克隆构建:如本文实验方法1.3.3所述,首先利用PCR扩增技术获取ADH1启动子区约500 bp片段,电泳结果如图1E所示,并将扩增到的ADH1的启动子区,即酵母源强启动子ADHP1p,



克隆构建到高表达质粒YEplac195中。然后在构建好的携带有酵母能够识别强启动子ADH1p的高表达质粒YEplac195-ADH1p中插入人源LIPIN1基因, 采用菌落PCR的方法筛选出正确插入LIPIN1基因的克隆7个, 菌落PCR的电泳结果如图1F所示。

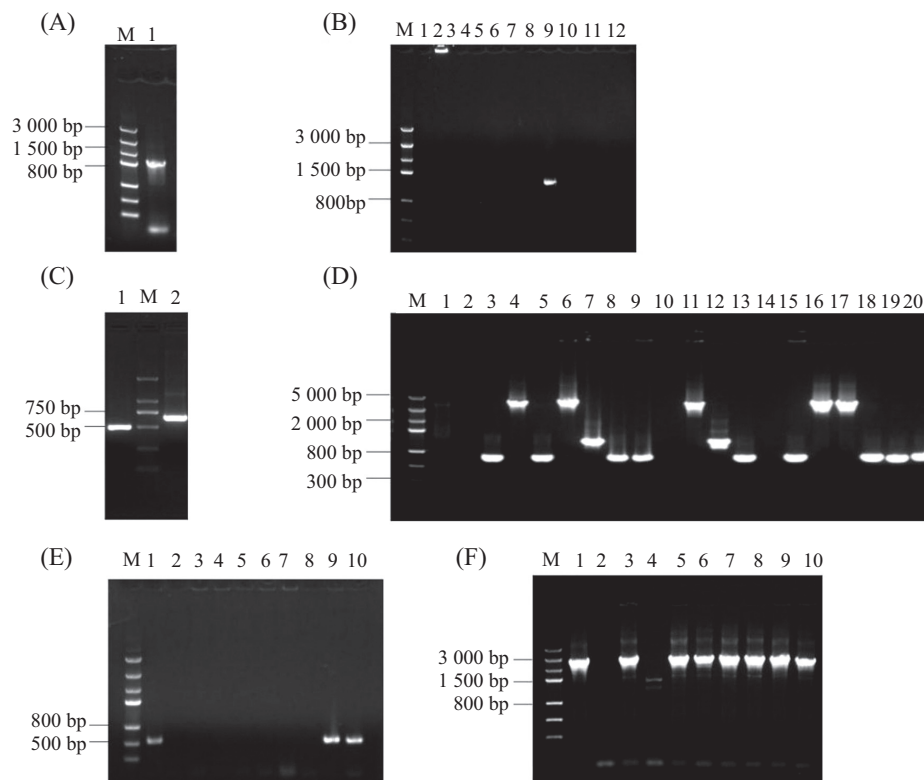
## 2.2 PAHI缺陷表型及性状分析

图2A为PAHI基因敲除后的脂毒敏感性检测结果。PAHI敲除后的酵母表现出对油酸极度敏感: WT在不含油酸和含有1 mmol/L油酸的YPD培养基中生长差异不大, PAHI缺陷型酵母在不含油酸的YPD培养基中生长基本正常, 但在含有1 mmol/L油酸的YPD培养基中基本不能生长。图2B为PAHI基

因敲除后的温度敏感性检测, 通过比较PAHI缺陷型酵母与WT酵母在30 °C和37 °C的生长状况, 发现PAHI敲除后的酵母表现出对温度十分敏感, 缺陷型酵母在37 °C时生长状况差。图2C为PAHI基因敲除后的碳源利用率检测, PAHI敲除后的酵母碳源利用效率要远低于WT酵母, 基本无法在以2%甘油作为碳源的培养基中生长。PAHI缺陷将导致酵母对温度、脂毒和碳源敏感, 这与文献[17,19]的结果一致。

## 2.3 脂素基因LIPIN1与酵母PAHI细胞功能同源性分析

将人源LIPIN1转入PAHI突变体中, 通过观察在PAHI缺失突变体中异源表达LIPIN1基因后, 酵母的

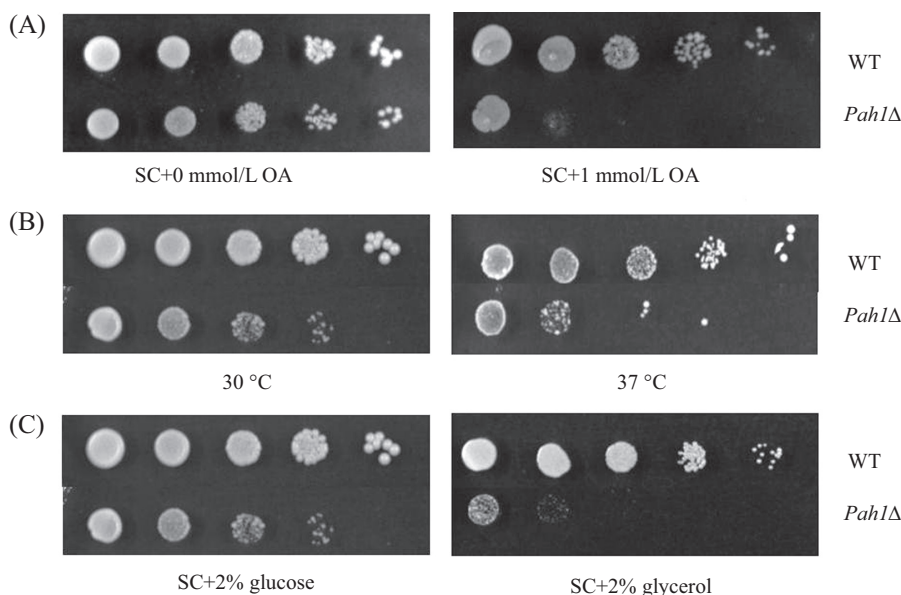


A: *PAHI* 双侧同源臂及 *KanMX4* 筛选标记基因的融合DNA的获取, 泳道1为含有 *PAHI* 双侧同源臂及 *KanMX4* 筛选标志的PCR产物; B: 酵母 *PAHI* 突变体的菌落PCR的鉴定, 泳道1~12为待鉴定的酵母 *PAHI* 突变体; C: *PAHI* 5'端同源臂和3'端同源臂的PCR扩增, 泳道1为5'端同源臂, 泳道2为3'端同源臂; D: *PAHI* 重组质粒的菌落PCR鉴定, 泳道1~20为克隆菌株的菌落PCR产物; E: ADH1p启动子的克隆构建, 泳道1为以基因组为模板的PCR产物(作为阳性参照), 泳道2为以空白质粒为模板的PCR产物(作为阴性参照); 泳道3~10为克隆菌株的菌落PCR产物; 泳道M为DNA分子量标记。

A: the integration DNA of *PAHI* bilateral homologous arms and *KanMX4* genes, lane 1 is PCR product of integration DNA of *PAHI* bilateral homologous arms and *KanMX4* genes; B: the identification of yeast *PAHI* mutant by yeast colony PCR, lane 1~12 are colony PCR product of yeast *PAHI* mutants; C: PCR amplification of 5' end and 3' end homologous arms of *PAHI*, lane 1 is PCR product of 5' end homologous arm; lane 2 is PCR product of 3' end homologous arm; D: the identification of *PAHI* recombinant plasmid by colony PCR, lane 1~20 are colony PCR products of clone strains; E: the construction of recombinant plasmid of ADH1p promoter, lane 1 is PCR product of yeast genome (as a positive control); lane 2 is PCR product of empty plasmid (as a negative control); lane 3~10 are PCR products of clone strains; F: the construction of recombinant plasmid YEplac195-ADH1p-LIPIN1, lane 1 is PCR product of YEP51-LIPIN1 (as a positive control); lane 2 is PCR product of empty plasmid (as a negative control); lane 3~10 are PCR products of clone strains. Lane M is DNA molecular weight marker.

图1 酵母PAHI突变体的构建和相关基因的克隆

Fig.1 The construction of *PAHI* mutant and the cloning of related gene



A: 脂毒敏感性检测, *PAH1*突变菌株及野生型菌株在添加0或1 mmol/L的SC的生长情况; B: 温度敏感性检测, *PAH1*突变菌株及野生型菌株在30 °C、37 °C孵育温度下的生长情况; C: 碳源利用率检测, *PAH1*突变菌株及野生型菌株在以2%的葡萄糖或2%的甘油作为碳源的SC中的生长情况。

A: lipotoxicity-resistance test of *PAH1* mutant, and wild type yeast that growing at SC with 0 or 1 mmol/L oleic acid; B: heat sensitivity test of *PAH1* mutant, and wild type yeast that growing at SC and incubated at 30 °C or 37 °C; C: utilization of carbon source test of *PAH1* mutant, and wild type yeast that growing at SC with 2% glucose or 2% glycerol.

图2 *PAH1*缺陷型酵母表型及性状分析

Fig.2 The phenotypic character analyses of the *PAH1* knockout yeast

脂毒抗性、温度敏感性、碳源利用效率上的表型恢复情况, 证明*LIPINI*与*PAH1*在功能上的互补。在脂毒抗性上, 如图3A所示, 外源*PAH1*高表达载体的转入显著地提高了*PAH1*缺陷型酵母对油酸的耐受性, 生长情况与WT相似; 外源*LIPINI*高表达载体的转入也明显地提高了*PAH1*缺陷型酵母对油酸的耐受性, 但与WT或转入外源*PAH1*基因的突变体相比, 生长情况稍差。在温度敏感性上, 如图3B所示, 外源*PAH1*和*LIPINI*高表达载体的转入同样能够提高*PAH1*缺陷型酵母对环境温度的耐受性, 表型恢复情况基本与脂毒抗性恢复情况一致。如图3C所示, 外源*PAH1*和*LIPINI*高表达载体的转入同样能够提高*PAH1*缺陷型酵母对环境碳源的利用效率, 表型恢复情况与脂毒抗性恢复情况一致。说明了, 两者在维持酵母生长代谢、缓解脂毒胁迫等方面也同样具有较高的功能保守性。

## 2.4 *LIPINI*与*PAH1*在脂类合成上的功能保守性

脂毒胁迫与脂类的合成密切相关<sup>[35]</sup>, 通过对*LIPINI*与*PAH1*在脂类合成上的功能保守性分析, 有助于进一步揭示*LIPINI*在人类脂毒抵抗中扮演的重要角色。通过构建*PAH1*缺陷型酵母, 发现*PAH1*缺陷型酵母与WT相比, 脂肪滴的数量显著减少, 如图4A

所示, 这是由于三酰甘油合成中起关键酶PAP缺失所造成的, PAP缺失直接导致三酰甘油为主的中性脂肪减少, 进而导致脂肪滴形成数量的减少。

同时, 为进一步验证*LIPINI*与*PAH1*所编码的PAP在功能上的保守性, 本文通过分析*LIPINI*在*PAH1*缺陷型酵母中异源表达时三酰甘油含量与脂肪滴数量的变化来检测两者的功能保守性。在脂肪滴形成上, 如图4A所示, *LIPINI*在*PAH1*缺陷型酵母中的异源表达能够显著提高酵母细胞内脂肪滴的形成数量, 其恢复情况基本与高表达*PAH1*的缺陷菌株一致。在三酰甘油含量上, *LIPINI*在*PAH1*缺陷型酵母中的异源表达同样能够显著提高酵母细胞内三酰甘油的含量, 其含量约为WT的70%, 这与高表达*PAH1*的缺陷菌株基本一致。该结果揭示了*LIPINI*可能通过促进三酰甘油和脂肪滴的形成来缓解脂毒胁迫。

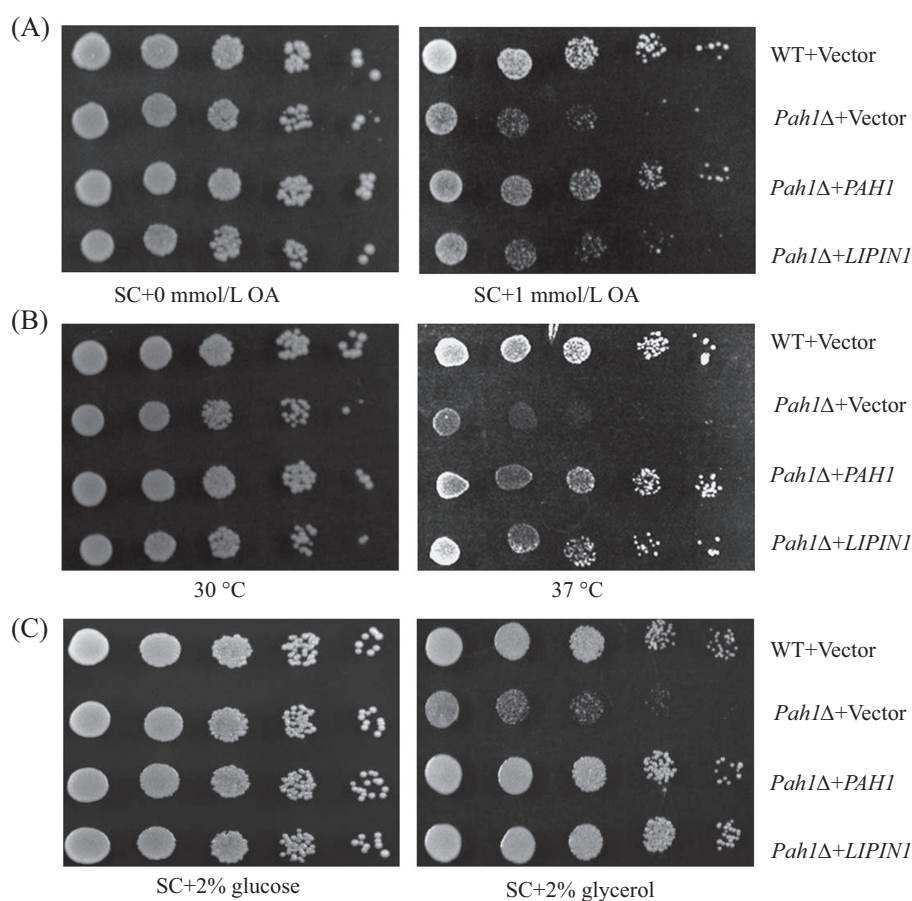
## 2.5 *LIPIN1p*与*PAH1p*生物信息学分析

通过对*LIPIN1p*与*PAH1p*进行保守结构域分布、同源序列分布及氨基酸序列比对分析, 发现两者具有较高的同源性, 同源性达到了48%。在结构域保守性分析中, 发现两者都具有两个保守的Lipin\_N结构域和类卤酸脱卤酶(haloacid dehalogenase-

like, HAD\_LIKE)结构域, 如图5A, 揭示了这两种不同物种来源的PAP均通过这两个同源结构域来执行脂类代谢及其他生长代谢相关的调控功能, 表明了人与酵母的PAP具有较高的结构和功能保守性。而经NCBI网站的Blast同源检索分析, 如图5B所示, PAH1p(NP\_013888)与LIPIN1p(NP\_663731.1)的同源序列点阵均分布在N末端区域和近C末端区域, 这与前面图5A分析的结构一致。为了进一步验证PAH1p与LIPIN1p在这两个区域的同源性, 本文利用Bioedit 7.1软件针对这两个区域进行了多序列比对, 如图5C所示, PAH1p与LIPIN1p在这两个区域的氨基酸序列高度同源。生物信息学的分析结果很好地印证了前面PAH1缺陷型的表型恢复研究。

### 3 讨论

LIPIN1作为脂代谢合成关键基因, 在脂代谢疾病研究中具有重大研究价值, 但局限于哺乳动物的复杂性, 许多未知的功能难以揭示, 而与其具有相似功能的酵母脂素基因PAH1则研究比较透彻。该基因受Zn介导调控, 并在多种脂类合成中扮演着重要作用<sup>[6]</sup>, 是研究脂代谢相关疾病及探索LIPIN1未知功能的重要突破口。本文利用酿酒酵母在脂类代谢系统研究中的优势, 通过基因敲除技术, 成功构建了PAH1缺陷型酵母, 通过对该缺陷型酵母进行表型分析, 证实了脂素基因PAH1在碳源利用、温度耐受和脂毒耐受上具有重要作用。通过在酵母中异源表达LIPIN1基因, 发现LIPIN1能够部分弥补由于PAH1



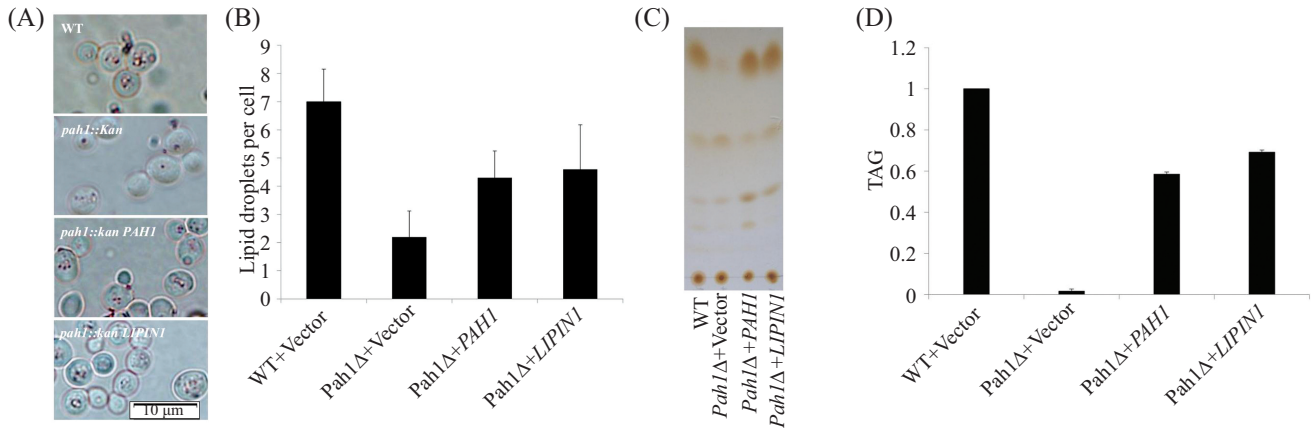
A: 外源PAH1或LIPIN1对PAH1突变菌株脂毒性表型恢复的影响, 携带空质粒、外源PAH1、LIPIN1基因高表达质粒的PAH1突变菌株在添加0或1 mmol/L的SC-Ura的生长情况; B: 外源PAH1或LIPIN1对PAH1突变菌株对温度敏感性恢复的影响, 携带不同质粒的PAH1突变菌株在30、37 °C 孵育温度下的生长情况; C: 外源PAH1或LIPIN1对PAH1突变菌株对碳源利用率恢复的情况, 携带不同质粒的PAH1突变菌株在以2%的葡萄糖或2%的甘油作为碳源的SC-Ura中的生长情况。

A: effect of exogenous PAH1 or LIPIN1 on the phenotype recovery of lipotoxicity- resistance of PAH1 mutant, empty vector, PAH1 or LIPIN1 in PAH1 mutant and wild type yeast that growing at SC-Ura with 0 or 1 mmol/L oleic acid; B: effect of exogenous PAH1 or LIPIN1 on the phenotype recovery of heat sensitivity of PAH1 mutant, yeast strains that growing at SC-Ura and incubated at 30 °C or 37 °C; C: effect of exogenous PAH1 or LIPIN1 on the phenotype recovery of utilization of carbon source of PAH1 mutant, yeast strains that growing at SC-Ura with 2% glucose or 2% glycerol.

图3 外源LIPIN1、PAH1基因对PAH1缺陷性酵母表型恢复的影响

Fig.3 Effect of exogenous PAH1 or LIPIN1 on the phenotype recovery of PAH1 mutant yeast



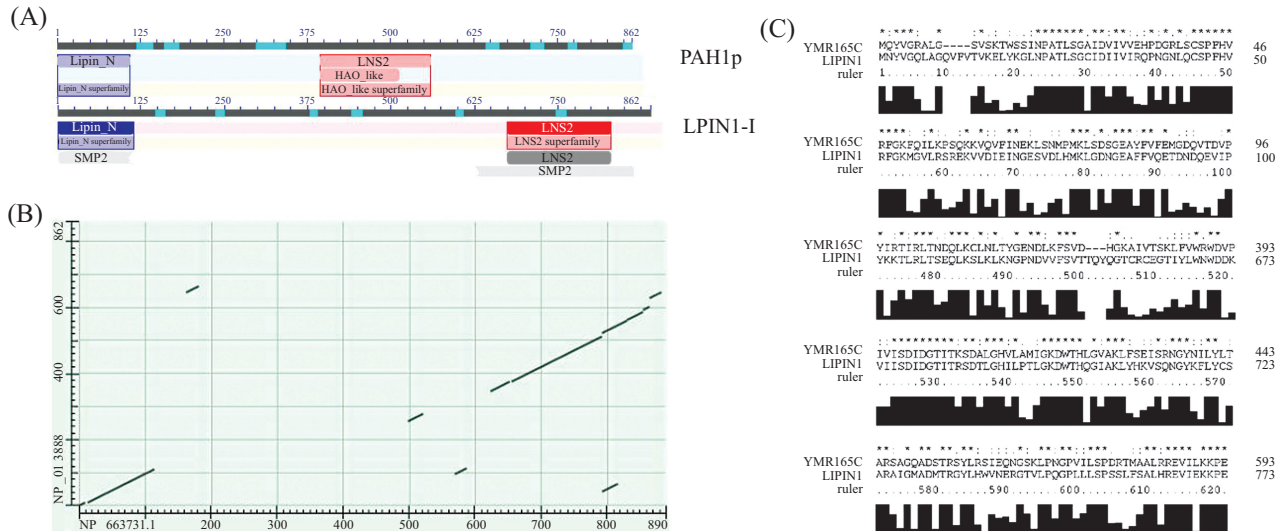


A: 脂肪滴油红O检测; B: 脂肪滴数量统计; C: 薄层层析法检测三酰甘油含量; D: 三酰甘油含量统计; 数据表示为均值±标准误。

A: staining of lipid droplets with the lipophilic dye oil red O in yeast; B: estimated lipid droplets number per cell; C: the triglyceride analyses by TLC; D: quantification of triglyceride content in TLC; Values were presented as mean±S.E.M.

图4 PAH1与LIPIN1在脂类合成上的功能保守性

Fig.4 Functional conservation of PAH1 and LIPIN1 in lipid synthesis



A: PAH1p和LIPIN1p保守结构域分析, 蓝色方框所示为LIPIN\_N超家族保守结构域, 红色方框所示为HAD\_LIKE超家族保守结构域(又称Lipin/Ned1/Smp2超家族结构域, 即LNS2超家族结构域); B: PAH1p和LIPIN1p同源序列分布点阵图, 横轴代表LIPIN1p序列, 纵轴代表PAH1p序列, 矩阵中的点代表的是两者的同源残基序列; C: PAH1p和LIPIN1p残基序列比对。

A: conserved domains analysis of PAH1p and LIPIN1p, and blue box represented LIPIN\_N superfamily conserved domain; red box represented HAD\_LIKE superfamily conserved domain; B: graphical analysis of conserved sequence distribution of PAH1p and LIPIN1p by dot-matrix plots, and horizontal axis represented sequence of LIPIN1p; vertical axis represented sequence of PAH1p; C: multiple sequence alignments of PAH1p and LIPIN1p.

图5 LIPIN1p与PAH1p的生物信息学分析

Fig.5 Bioinformatic analysis of LIPIN1p and PAH1p

缺失后所造成温度敏感, 这与Grimsey等<sup>[36]</sup>提出的PAH1与LIPIN1在温度敏感上功能互补的结论一致; 而我们在进一步的深入研究发现, LIPIN1还在碳源利用及脂毒胁迫等方面与PAH1具有功能互补性, 而在脂滴及三酰甘油形成上, LIPIN1与PAH1具有较高的功能保守性, 论证了LIPIN1能够通过促进细胞脂类合成及脂肪滴形成来解救脂毒胁迫的可能性。通过生物信息学技术, 我们对LIPIN1与PAH1进行氨

基酸序列及结构域进行比较分析, 发现酵母PAH1与人源LIPIN1氨基酸序列具有较高的同源性, 同源性达到48%, 同时都具有两个保守的Lipin\_N结构域和HAD\_LIKE结构域, 这一结果很好地佐证了LIPIN1与PAH1在功能上的保守性。

酵母遗传背景相对清晰、易于操作, 是一个非常宝贵的模式生物。酵母作为高等真核生物, 能够通过未知基因在酵母中异源表达及细胞功能分析

来研究该基因的功能<sup>[37]</sup>, 本次的研究工作也再一次说明酵母是简化研究高等生物复杂基因功能的有利模式生物。

### 参考文献 (References)

- 1 Parks EJ. Dietary carbohydrate's effects on lipogenesis and the relationship of lipogenesis to blood insulin and glucose concentrations. *Br J Nutr* 2002; 87 Suppl 2: S247-53.
- 2 Sieri S, Krogh V, Berrino F, Evangelista A, Agnoli C, Brighenti F, *et al.* Dietary glycemic load and index and risk of coronary heart disease in a large italian cohort: the EPICOR study. *Arch Intern Med* 2010; 170(7): 640-7.
- 3 Mingrone G, Henrikson FL, Greco AV, Krogh LN, Capristo E, Gastaldelli A, *et al.* Triglyceride-induced diabetes associated with familial lipoprotein lipase deficiency. *Diabetes* 1999; 48(6): 1258-63.
- 4 Peterfy M, Phan J, Xu P, Reue K. Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Genet* 2001; 27(1): 121-4.
- 5 Nadra K, de Preux Charles AS, Medard JJ, Hendriks WT, Han GS, Gres S, *et al.* Phosphatidic acid mediates demyelination in Lpin1 mutant mice. *Gene Dev* 2008; 22(12): 1647-61.
- 6 Yao-Borengasser A, Rasouli N, Varma V, Miles LM, Phanavanh B, Starks TN, *et al.* Lipin expression is attenuated in adipose tissue of insulin-resistant human subjects and increases with peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *Diabetes* 2006; 55(10): 2811-8.
- 7 Phan J, Reue K. Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. *Cell Metab* 2005; 1(1): 73-83.
- 8 Han GS, Wu WI, Carman GM. The *Saccharomyces cerevisiae* lipin homolog is a Mg<sup>2+</sup>-dependent phosphatidate phosphatase enzyme. *J Biol Chem* 2006; 281(14): 9210-8.
- 9 Brindley DN. Intracellular translocation of phosphatidate phosphohydrolase and its possible role in the control of glycerolipid synthesis. *Prog Lipid Res* 1984; 23(3): 115-33.
- 10 Brindley DN. Lipid phosphate phosphatases and related proteins: Signaling functions in development, cell division, and cancer. *J Cell Biochem* 2004; 92(5): 900-12.
- 11 Oelkers P, Cromley D, Padamsee M, Billheimer JT, Sturley SL. The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast. *J Biol Chem* 2002; 277(11): 8877-81.
- 12 Phan J, Peterfy M, Reue K. Lipin expression preceding peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is critical for adipogenesis *in vivo* and *in vitro*. *J Biol Chem* 2004; 279(28): 29558-64.
- 13 Smith SW, Weiss SB, Kennedy EP. The enzymatic dephosphorylation of phosphatidic acids. *J Biol Chem* 1957; 228(2): 915-22.
- 14 Lin YP, Carman GM. Purification and characterization of phosphatidate phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1989; 264(15): 8641-5.
- 15 Han GS, Siniossoglou S, Carman GM. The cellular functions of the yeast lipin homolog PAH1p are dependent on its phosphatidate phosphatase activity. *J Biol Chem* 2007; 282(51): 37026-35.
- 16 Soto-Cardalda A, Fakas S, Pascual F, Choi HS, Carman GM. Phosphatidate phosphatase plays role in zinc-mediated regulation of phospholipid synthesis in yeast. *J Biol Chem* 2012; 287(2): 968-77.
- 17 Irie K, Takase M, Araki H, Oshima Y. A gene, SMP2, involved in plasmid maintenance and respiration in *Saccharomyces cerevisiae* encodes a highly charged protein. *Mol Gen Genet* 1993; 236 (2/3): 283-8.
- 18 Santos-Rosa H, Leung J, Grimsey N, Peak-Chew S, Siniossoglou S. The yeast lipin Smp2 couples phospholipid biosynthesis to nuclear membrane growth. *EMBO J* 2005; 24(11): 1931-41.
- 19 Fakas S, Qiu YX, Dixon JL, Han GS, Ruggles KV, Garbarino J, *et al.* Phosphatidate phosphatase activity plays key role in protection against fatty acid-induced toxicity in yeast. *J Biol Chem* 2011; 286(33): 29074-85.
- 20 Adeyo O, Horn PJ, Lee SK, Binns DD, Chandrasah A, Chapman KD, *et al.* The yeast lipin orthologue PAH1p is important for biogenesis of lipid droplets. *J Cell Biol* 2011; 192(6): 1043-55.
- 21 Choi HS, Su WM, Morgan JM, Han GS, Xu Z, Karanasios E, *et al.* Phosphorylation of phosphatidate phosphatase regulates its membrane association and physiological functions in *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of SER (602), THR (723), AND SER (744) as the sites phosphorylated by CDC28 (CDK1)-encoded cyclin-dependent kinase. *J Biol Chem* 2011; 286(2): 1486-98.
- 22 Han GS, O'Hara L, Carman GM, Siniossoglou S. An unconventional diacylglycerol kinase that regulates phospholipid synthesis and nuclear membrane growth. *J Biol Chem* 2008; 283(29): 20433-42.
- 23 Sasser T, Qiu QS, Karunakaran S, Padolina M, Reyes A, Flood B, *et al.* Yeast lipin 1 orthologue pah1p regulates vacuole homeostasis and membrane fusion. *J Biol Chem* 2012; 287(3): 2221-36.
- 24 Carman GM, Han GS. Phosphatidic acid phosphatase, a key enzyme in the regulation of lipid synthesis. *J Biol Chem* 2009; 284(5): 2593-7.
- 25 Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, *et al.* Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 1998; 14(2): 115-32.
- 26 Kitazono AA. Improved gap-repair cloning method that uses oligonucleotides to target cognate sequences. *Yeast* 2009; 26(9): 497-505.
- 27 Orr-Weaver TL, Szostak JW. Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80(14): 4417-21.
- 28 Grimsey N, Han GS, O'Hara L, Rochford JJ, Carman GM, Siniossoglou S. Temporal and spatial regulation of the phosphatidate phosphatases lipin 1 and 2. *J Biol Chem* 2008; 283(43): 29166-74.
- 29 Garbarino J, Padamsee M, Wilcox L, Oelkers PM, D'Ambrosio D, Ruggles KV, *et al.* Sterol and diacylglycerol acyltransferase deficiency triggers fatty acid-mediated cell death. *J Biol Chem* 2009; 284(45): 30994-1005.
- 30 Schneiter R, Daum G. Extraction of yeast lipids. *Methods Mol Biol* 2006; 313: 41-5.
- 31 Kuerschner L, Ejsing CS, Ekroos K, Shevchenko A, Anderson KI, Thiele C. Polyene-lipids: A new tool to image lipids. *Nat Methods* 2005; 2(1): 39-45.
- 32 Bilyk A, Piazza GJ, Bistline Jr RG, Haas MJ. Separation of cholesterol, and fatty acylglycerols, acids and amides by thin-layer chromatography. *Lipids* 1991; 26(5): 405-6.
- 33 Binns D, Januszewski T, Chen Y, Hill J, Markin VS, Zhao Y, *et al.* An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies. *J Cell Biol* 2006; 173(5): 719-31.
- 34 Mount DW. Bioinformatics: Sequence and genome analysis Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- 35 Garbarino J, Sturley SL. Saturated with fat: New perspectives on lipotoxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009; 12(2): 110-6.
- 36 Grimsey N, Han GS, O'Hara L, Rochford JJ, Carman GM, Siniossoglou S. Temporal and spatial regulation of the phosphatidate phosphatases lipin 1 and 2. *J Biol Chem* 2008; 283(43): 29166-74.
- 37 刘 擎, 余 龙. 酵母: 一种模式生物. 生命的化学(Liu Jing, Yu Long. Chemistry of Life) 2000; 20(2): 61-5.