

酿酒酵母TORC1信号通路重要调控元件Ego1/Ego3复合物的共表达及纯化

马瑞^{1,2} 李昂² 王玉炯¹ 张勇^{2*}

(¹宁夏大学生命科学学院, 银川 750021; ²上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

摘要 支架和连接蛋白在调节信号级联传导中起着重要作用。最近, Ego1/Ego3蛋白复合物被证实作为定位在细胞内体膜表面的支架蛋白在TORC1信号通路感知氨基酸丰度方面发挥重要调控作用。研究中通过克隆酵母Ego1与Ego3基因, 构建了双T7启动子的双元原核表达载体。通过在大肠杆菌中共表达、共破菌以及带有不同抗性的两个质粒共转化的方法来重组表达Ego1/Ego3复合物。结果发现, Ego1可与Ego3蛋白形成可溶性的复合物, 但纯化后蛋白比例存在明显差异, 且Ego1有降解现象。通过构建一系列带组氨酸标签截短的Ego1与全长Ego3共表达, 依靠pull down纯化来鉴定Ego1与Ego3相互作用的区段。最终发现, 共转化pRSFDuet-mcs1Ego1(35-184)和pACYDuet-mcs1Ego3可共表达、纯化到较稳定的比例较一致的复合物, 从而为进一步对Ego1/Ego3蛋白复合物进行生化鉴定和结构生物学研究奠定了基础。

关键词 TOR信号通路; EGO复合物; 双元载体; 蛋白纯化

Co-expression and Purification of Recombinant Ego1 in Complex with Ego3 from *Saccharomyces cerevisiae*

Ma Rui^{1,2}, Li Ang², Wang Yujiong¹, Zhang Yong^{2*}

(¹School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; ²School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract Scaffold and adaptor proteins play crucial roles in many key signaling cascades. Ego1 is a scaffold protein and together with Ego3 forms a subunit of EGO complex that is shown to be responsible for localization of TORC1 to the endosomal membrane surface. To biochemically and biophysically characterize the Ego1/Ego3 complex, we constructed various binary expression vectors with *Ego1* and *Ego3* gene to co-express recombinant Ego1 and Ego3 protein. Co-expression of Ego1 and Ego3 in *E. coli* led to a soluble protein complex. By co-expression after co-transformation with different antibiotic-resistant duet plasmids into cells, the protein ratio problem could be improved in the complex. Furthermore, we subcloned several truncated Ego1 and full-length Ego1 into binary vectors and characterized the binding between the truncated Ego1 and Ego3 by co-purification. Finally, we obtained a stable truncated Ego1 (35-184) fragment in complex with Ego3 via co-transformation of pRSFDuet-Ego1 (35-184) and pACYDuet-Ego3.

Key words TORC1 signaling pathway; EGO complex; binary vector; purification

收稿日期: 2014-01-25 接受日期: 2014-03-12

国家自然科学基金(批准号: 31200597、81202397、J1210047)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-34205996, E-mail: yzhang2011@sjtu.edu.cn

Received: January 25, 2014 Accepted: March 12, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31200597, 81202397, J1210047)

*Corresponding author. Tel: +86-21-34205996, E-mail: yzhang2011@sjtu.edu.cn

网络出版时间: 2014-05-26 16:12 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.06.0031.html>

TOR(target of rapamycin)是真核生物体内结构和功能十分保守的非典型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属于磷脂酰肌醇激酶相关激酶(phosphatidylinositol kinase-related kinase, PIKK)蛋白家族^[1]。TOR最初在酵母中被发现,随后从果蝇到哺乳动物均发现了酵母TOR的同源物,统称mTOR(mechanistic target of rapamycin)^[2-4]。人类mTOR是约289 kDa的大分子量蛋白质,作为催化亚基参与形成两种不同形式的多蛋白复合物:TORC1(TOR complex 1)及TORC2(TOR complex 2)^[5]。其中, TORC1能够整合细胞生长因子、激素、ATP和氨基酸等多种外界环境的信号,控制细胞的蛋白合成和细胞自噬等生理功能,形成对细胞生长、增殖和分化起到中枢调控作用的TOR信号转导通路^[6-8]。该通路的失调已被证实与多种人类疾病相关,包括癌症、糖尿病与心血管疾病等^[9-10]。

哺乳动物的mTORC1在感受胞内氨基酸丰度信号时,发挥重要作用的元件被认为是由四种小蛋白形成的异源二聚体Rag GTPases(RagA/RagC或RagB/RagD)^[11]。Rag GTPases并不能在体外直接激活mTORC1激酶活性,但Rag蛋白形成的异二聚体可能通过结合mTORC1成员Raptor,协助整个复合物转移至溶酶体膜表面含有其激活因子Rheb^{GDP}的区域来提高通路活性^[12-13]。然而,在Rag蛋白序列中并未发现明显的膜结合基序。最近的研究表明,Rag GTPases介导的mTORC1亚细胞定位及激活,是依靠Rag蛋白结合mTORC1信号通路下游的重要调控元件Regulator蛋白复合物完成的^[14]。哺乳动物Regulator多蛋白复合物主要由五个小亚基构成,包括P18(LAMTOR1)、P14(LAMTOR2)、MP1(LAMTOR3)、C7orf59(LAMTOR4)和HBXIP(LAMTOR5)^[14]。其中,Regulator复合物的P18蛋白亚基被认为可通过N-端豆蔻酰化和棕榈酰化脂修饰来锚定在细胞内体(endosomal)或者溶酶体(lysosomes)膜表面,进而作为支架蛋白(scaffold protein)来招募另外两个复合体MP1/P14和C7orf59/HBXIP停留在endosomal或lysosomes的膜上,最终形成的整个Regulator复合物。目前证实,Regulator可作为Rag GTPases的鸟苷酸交换因子(GEF),结合Rag GTPases后在介导mTORC1靶向正确的亚细胞定位和激活中发挥关键作用^[15]。在酵母中同样也发现了与哺乳动物Rag GTPases同源、由GTR1和GTR2组成的异源二聚体GTR GTPases,该二聚体被认为

可结合膜定位的小蛋白Ego1,形成包含至少Ego1、Ego3、GTR1、GTR2这四个亚基的酵母EGO(exit from growth arrest)蛋白复合物,从而亚细胞定位于细胞内体膜及液泡膜上^[16-17]。虽然EGO复合物中的Ego3与哺乳动物MP1、P14异源二聚体在一级序列上同源性很低,但最近结构生物学研究揭示,Ego3以二聚体存在,与MP1/P14异源二聚体结构和功能同源性很高^[18]。此外,基于Ego1与P18类似的膜定位信息,酿酒酵母(*S. cerevisiae*)中的EGO复合物被认为是哺乳动物Regulator的同源类似蛋白复合物,有着相似的生物学功能^[19]。但目前对EGO(Regulator)复合物作用机制尚不明确,因而对氨基酸丰度如何精确调控该复合物、促进TORC1激酶的激活机理仍然不清楚。EGO复合物与Regulator复合物中所含各蛋白亚基的氨基酸序列多相似性很低,依靠一级序列分析仅能得到非常有限的生物学信息,因而对这些蛋白亚基进一步开展生化鉴定和结构生物学研究,对于揭示EGO复合物和Regulator复合物作用机制及理解氨基酸水平如何向TORC1信号通路传递,将会起到非常大的作用。本研究克隆了酵母Ego1与Ego3基因,构建了双T7启动子的二元原核表达载体。通过在大肠杆菌中共表达、共破菌,以及带有不同抗性的两个质粒共转化的方法,来重组表达了Ego1/Ego3复合物,且通过构建一系列带组氨酸标签截短的Ego1与全长Ego3共表达、纯化来鉴定Ego1与Ego3相互作用的区段。最终发现,共转化pRSFDuet-mcs1Ego1(35-184)和pACYDuet-mcs1Ego3可表达、纯化到稳定的比例较一致的复合物,从而为进一步对EGO复合物中Ego1/Ego3亚基进行生化鉴定和结构生物学研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

原核二元表达载体pRSFDuet-1、pACYCDuet-1;宿主菌株*E. coli* DH5 α 、表达菌株*E. coli* BL21(DE3)及酿酒酵母(*S. cerevisiae*)均为本实验室保存;KOD、Taq DNA聚合酶分别购自TaKaRa公司及北京康为世纪生物科技有限公司; dATP、dTTP及T4 DNA聚合酶均购自New England Biolabs公司;酵母基因组提取试剂盒(TIANamp yeast DNA kit)购自天根生化科技有线公司;质粒小量制备试剂盒、回收试剂盒均购自QIAGEN公司;化学药品均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆和重组表达载体的构建 酿酒酵母基因组DNA的提取使用试剂盒, 操作步骤按照说明书进行。酵母EGO复合物的各基因扩增引物根据NCBI数据库中相应基因序列设计, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。氨基酸序列分析显示, Ego1的N-端具有双半光氨酸特征基序(GXXXXCC), 可作为潜在的酰基化位点, 因此这些位点在设计引物时被设计序列突变为Ala。此外, Ego1蛋白的二级结构预测(PSIPRED^[20])结果显示, Ego1主要由无规卷曲区(Coil)连接的螺旋区(Helix)构成, 在其N-端和C-端均有明显的无规卷曲区, 基于此分析结果设计了相应的亚克隆Ego1截断突变体的引物。研究中所用部分引物序列见表1。以提取的酵母基因组DNA为模板, PCR扩增相应的Ego1、Ego3、Gtr1、Gtr2基因表达框架, 对获得的PCR产物进行凝胶纯化备用。

相应表达载体的构建均采用不依赖于连接反应酶克隆方法(ligation independent cloning, LIC)^[21]。该方法利用T4 DNA聚合酶同时具有5'→3' DNA聚合酶活性和3'→5' DNA外切酶活性的特点, 在补充特定的dNTP的体系中, 线性载体和待插入DNA片段产生10~15个碱基的黏性末端, 互补的黏性末端可退火连接产生重组环状质粒, 转化到感受态细胞, 经细菌的修复系统将缺口进行修复形成重组子。具体步骤如下: 依据pRSFduet-1、pACYAduet-1载体中第一、第二个多克隆位点序列, 分别设计相应引物, 采用PCR方法使相应载体各多克隆位点线性化。之后, 使用T4 DNA polymerase处理体系: 4 μL NEB2 BUFFER, 1 μL dTTP/dATP(100 mmol/L stock), 1 μL DTT(100 mmol/L stock), 0.4 μL BSA(100×), 1 μL T4

DNA polymerase(NEB: M0203S), 30 μL DNA, 对相应的凝胶纯化线性化载体和插入DNA片段分别在室温处理2 h, 纯化后分别以比例1:1或1:10(载体: 插入片段)混合DNA, 室温放置连接15 min, 随即转化E.coli DH5α感受态细胞, 经抗性筛选, 挑取单菌落于液体LB培养基培养, 抽提质粒送测序公司进行测序。

1.2.2 重组蛋白的表达和Ni柱亲和层析 将测序正确的质粒转化E.coli BL21(DE3)感受态细胞, 经相应的抗性筛选, 挑取菌落到含有抗生素的50 mL液体LB培养基中, 37 °C培养过夜。再按1:100比例转接入1 L LB培养基中, 继续培养数小时, 至菌液密度 D_{600} 达到0.8~1.0时加入终浓度0.2 mmol/L IPTG诱导, 诱导表达条件为16 °C, 18~20 h。离心收集菌体用Ni柱平衡Buffer(25 mmol/L Tris pH8.0, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L咪唑)重悬, 使用低温超高细胞破碎机(JNBIO-C2, 广州聚能生物科技有限公司)在4~6 °C下进行裂解。将裂解液于4 °C、14 000 r/min条件下离心30 min, 收集上清, 过Ni-NTA亲和层析柱。上样后加Ni柱平衡缓冲液冲洗以减少非特异蛋白结合, 再以含不同浓度的咪唑洗脱液进行梯度洗脱(25 mmol/L Tris pH8.0, 200 mmol/L NaCl, 40, 110, 200 mmol/L imidazole)。对洗脱液进行12%或15% SDS-PAGE分析鉴定。

1.2.3 分子筛凝胶层析 研究中用Superdex 75(HR 10/30)柱子, 首先用两个柱体积的缓冲液进行平衡, 以0.5 mL/min流速平衡40~60 mL, 至UV吸光度不再变化, 电导率值达到缓冲液盐浓度的对应值; 上样时样品体积不应超过2 mL, 先在INJECT模式下进样, 进样结束后切换回LOAD模式, 按每管收集0.5 mL依

表1 实验所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3')(下划线标记出linker区序列) Sequences of primers (5'→3') (Underline is linker sequence)
Ego1-FW	CAG GGA CCC GGC TCA <u>GGA</u> ATG GGA GCC GTA CTC AGC TGT
Ego1-RV	GAC CCA GAG CCA <u>CCT</u> TAA AAG GGA ACC GTC AAG GGG CCT
Ego3-FW	CAG GGA CCC GGC TCA <u>GGA</u> ATG GTG ATG CTC CAT TCT AAA A
Ego3-RV	GAC CCA GAG CCA <u>CCT</u> TAA CCT AGC TTG TAG CCA AAC A
Rsf C1-FW/Acy C1-FW	GGT GGC TCT GGG TCA <u>GTC</u> GAA CAG AAA GTA ATC G
Rsf C1-RV/Acy-C1-RV	GCC GGG TCC CTG AAA GAG GAC TTC AAG GCT GTG GTG ATG ATG GTG
Rsf C2-FW	GGT GGC TCT GGG TCA <u>CTA</u> GCG CAG CTT AAT TAA CCT
Rsf C2-RV	GCC GGG TCC CTG AAA GAG GAC TTC AAG <u>TAT</u> CCA ATT GAG ATC TGC CAT

次收集流出液; 根据UV吸光值收集对应管流出液, 进行SDS-PAGE分析。

2 结果

2.1 Ego1氨基酸序列分析

酵母Ego1和人类P18蛋白氨基酸序列分析发现, 虽然这两个蛋白在氨基酸一级序列上相似度并不高(14.13% identity), 但在这些蛋白的N-端均具有潜在的豆蔻酰化(myristoylation)和棕榈酰化(palmitoylation)修饰位点, 且在Ego1和P18蛋白序列中分享显著的酸性/双亮氨酸溶酶体定位信号基序(图1), 表明这些蛋白对膜的亲和性和定位特异性。而对Ego1蛋白二级结构预测结果显示, 其主要由无规卷曲区(Coil)间隔的螺旋(Helix)结构构成, 对人的P18蛋白二级结构预测表明它也具有相似的结构特征。基于这些特征, 推测Ego1(P18)蛋白在EGO(Regulator)复合物形成时, 很可能被诱导而折叠成特定的高级结构, 从而作为scaffold结合该复合物中其他亚基, 将复合物正确亚定位于膜上^[22]。

2.2 基因克隆和重组共表达载体的构建

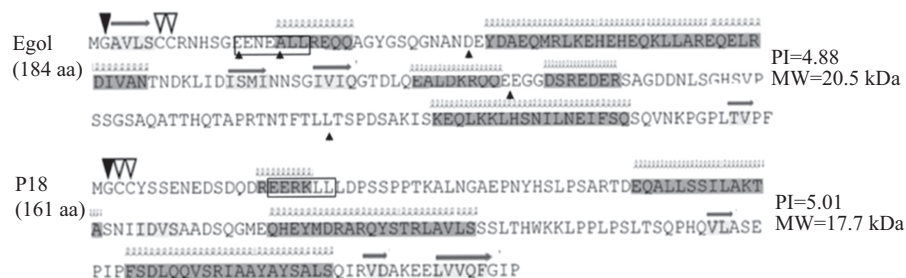
以酿酒酵母(*S. cerevisiae*)基因组为模板, 设计引物分别扩增酵母EGO复合物中各成员Ego1、Ego3、Gtr1、Gtr2基因的表达框架。获得的扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 片段大小分别位于550, 500, 933, 1 026 bp处, 与已知各基因的ORF序列大小相符, 可初步确定这些扩增片段为目的片段。扩增产物经胶回收纯化后分别使用T4 DNA聚合酶进行黏性末端处理, 可与先前T4 DNA聚合酶处理过

的pRSFDuet-1或pACYCDuet-1线性化载体进行连接, 获得重组质粒后测序鉴定。测序结果证实, Ego1、Ego3基因的ORF序列分别被插入到pRSFDuet-1或pACYCDuet-1载体的第1个多克隆位点MCS1和第2个多克隆位点MCS2。本研究构建了卡那霉素(Kn)抗性的重组质粒pRSFDuet-mcs1Ego1、pRSFDuet-mcs1Ego3、pRSFDuet-Ego1-Ego3、pRSFDuet-Ego3-Ego1, 氯霉素(Cm)抗性重组质粒pACYCDuet-mcs1Ego1、pACYCDuet-mcs1Ego3。构建的双元重组质粒可以同时进行两个蛋白的共表达, 不同抗性标记的双元载体可以配合使用, 以进行多蛋白同时表达。

2.3 Ego1/Ego3复合物的重组共表达和纯化

研究中使用了具有两个T7启动子的双元表达载体pRSFDuet-1或pACYCDuet-1, 这类载体在第一个T7启动子序列的下游均含有编码6个组氨酸(6His)的密码子。由此将基因构建在第一个多克隆位点的重组表达质粒, 经在*E. coli*中诱导表达后, 获得的融合蛋白N-端都带有组氨酸标签, 故可采用Ni柱亲和层析法进行提纯。而插入到第二个多克隆位点处的基因序列, 并不带有任何标签序列, 因此该克隆位点所表达的蛋白自身无法通过亲和层析提纯。只有当第一个克隆位点表达蛋白产物与第二个克隆位点表达的蛋白存在强相互作用形成蛋白复合物时, 第二个克隆位点所表达的蛋白才可被带组氨酸标签的第一个克隆位点表达蛋白产物pull down纯化。该双元共表达系统也可应用于蛋白相互作用的探讨。

我们之前曾尝试重组表达纯化单独的Ego1或



Ego1(NCBI accession NO. NP_012932)和P18(NCBI accession No. NP_060377) 蛋白序列的二级结构预测中出现的折叠区域被显示为阴影和相应序列上螺旋/片层箭头标记; 潜在的豆蔻酰化位点在序列上方用“▼”标记, 棕榈酰化位点用“▽”标记; 方框区标注出了同源序列共同具有的酸性/双亮氨酸溶酶体定位信号基序; Ego1相应的截短克隆被用“▲”在序列下方标出。

Predicted secondary structures of Ego1 (NCBI accession NO. NP_012932) and P18 (NCBI accession No. NP_060377) were indicated by shadow zone and corresponding helix for α -helices and arrow for β -strand; The potential myristoylation “▼” and palmitoylation “▽” sites were indicated above the sequence; The predicted acid/dileucine lysosome localization signal sequence were showed in box. In addition, various truncated Ego1 constructs were marked with “▲” under the sequence.

图1 酵母Ego1和人类P18蛋白氨基酸序列分析

Fig.1 Sequence analysis of yeast Ego1 and human P18

P18蛋白, 均不成功(数据未示)。在本研究中, 我们设想Ego1在形成Ego1/Ego3复合物时, 或许能促使形成正确折叠的Ego1获得纯化。此外, 共表达、纯化Ego1和Ego3蛋白, 也将在体外进一步验证这两个蛋白亚基间相互作用的强弱。因此, 将构建正确的重组表达质粒pRSFDuet-Ego1-Ego3转化*E. coli* BL21(DE3), 共表达Ego1和Ego3后, 通过Ni柱亲和层析可以初步纯化得到二者的可溶复合物, 如图2所示。该结果验证了两者存在较强相互作用。研究中发现, 在*E. coli*中进行Ego1与Ego3共表达时, Ego1的表达量可获得明显提高。但在15% SDS-PAGE上也观察到纯化的复合物中Ego1和Ego3两者蛋白量比例存在较大差异, 带组氨酸标签的Ego1蛋白量明显多于Ego3量(图2B)。因此我们又构建了pRSFDuet-Ego3-Ego1, 试图通过交换两个多克隆位点的插入基因, 来分析重组蛋白量差异原因。使用新的构建载体, 在相似的表达、纯化条件下所获得的复合物中带组氨酸标签的Ego3蛋白量明显多于Ego1量(图2C)。基于纯化的复合物中蛋白量较多的往往是带组氨酸标签的重组蛋白这一结果, 我们推测纯化中Ego1与Ego3蛋白量差异并不是由各自基因的表达

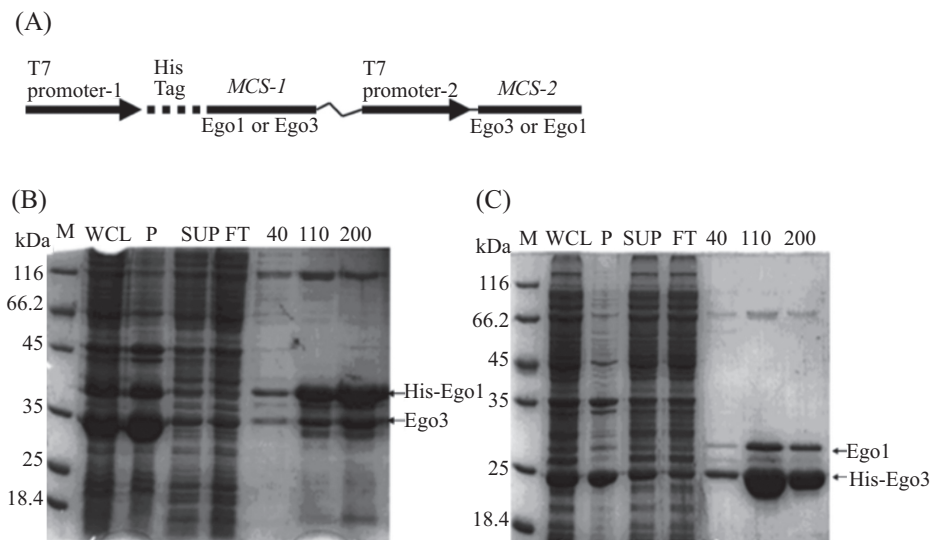
水平差异造成的, 更可能是相互作用并不是非常稳定, 表现为被pull down纯化下来的蛋白量较低所致。

为了改善Ego1和Ego3在纯化的复合物中的比例, 我们通过在*E. coli* BL21(DE3)共转化两个不同抗性的质粒pRSFDuet-mcs1Ego1与pACYDuet-mcs1Ego3, 形成Kn和Cm双抗性菌落。对获得的双抗性菌落进行培养后诱导表达, 发现通过亲和层析纯化的共表达的Ego1和Ego3蛋白量在15% SDS-PAGE上显示蛋白比例接近1:1。

但在经过分子筛进一步对Ni柱纯化的Ego1/Ego3复合物纯化后, 通过SDS-PAGE观察到在低分子量处出现杂带。在前期纯化重组表达的Ego3实验中, Ego3蛋白一直很稳定, 未见降解。因此, 低分子量处出现的杂带被认为是Ego1出现降解现象。

2.4 EGO复合物四个亚基的重组表达及共纯化

酵母中EGO复合物含有至少四个亚基Ego1、Ego3、Gtr1、Gtr2。研究中试图重组表达这四个蛋白亚基, 以期形成整个EGO复合物时, Gtr1/Gtr2能对Ego1/Ego3复合物起到稳定作用。我们构建了无亲和和标签的重组表达质粒pRSFDuet-msc2Gtr1和pRSFDuet-msc2Gtr2, 并与二元表达质粒pRSFDuet-Ego1-

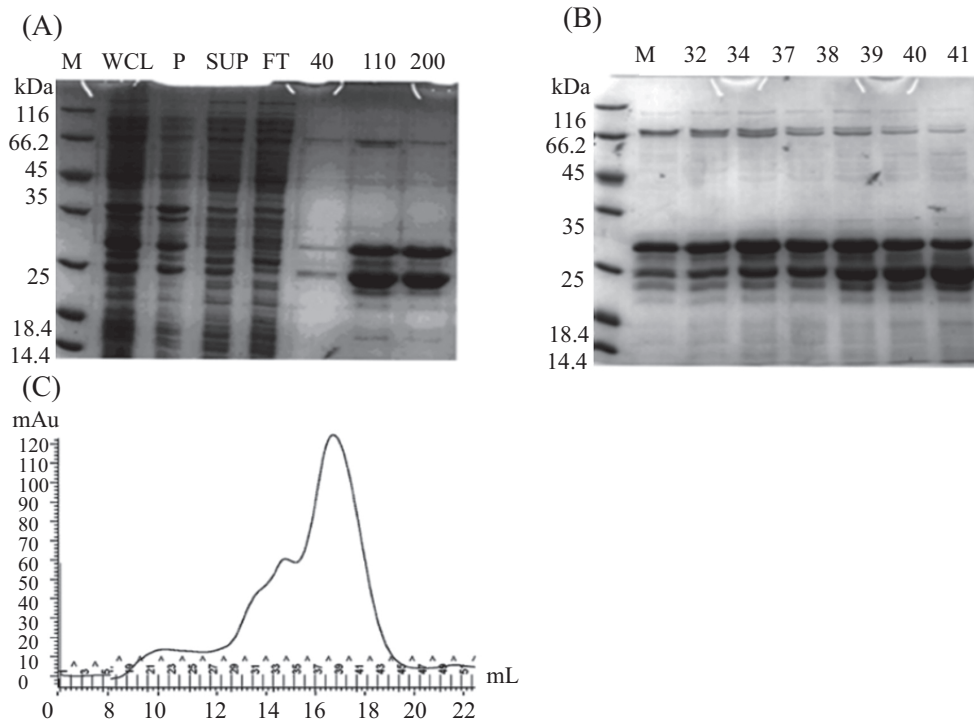


A: 构建pRSFDuet-1或pACYDuet-1二元表达载体的多克隆位点框架草图; B: 使用pRSFDuet-Ego1-Ego3载体共表达、Ni柱亲和层析纯化结果; C: 使用pRSFDuet-Ego3-Ego1载体共表达、Ni柱亲和层析纯化结果。M: 蛋白marker; WCL: 全菌裂解液; P: 沉淀; SUP: 上清; FT: 流过液; 40、110、200: 咪唑浓度(mmol/L)。

A: Construct schema, illustrating the multiple cloning sites of the duet vectors pRSFDuet-1 or pACYDuet-1; B: SDS-PAGE of Ni affinity purified the co-expressed Ego1 and Ego3 protein using pRSFDuet-Ego1-Ego3 vector; C: SDS-PAGE of Ni affinity purified the co-expressed Ego1 and Ego3 protein with pRSFDuet-Ego3-Ego1 vector. M: marker; WCL: whole cell lysis; P: precipitate; SUP: supernatant; FT: flow through; 40, 110 and 200: concentrations of imidazole buffer (mmol/L).

图2 二元载体构建和Ni柱亲和层析纯化的共表达Ego1/Ego3结果图

Fig.2 Schema of duet vector construct and the co-expressed recombinant Ego1/Ego3 complex after purified by Ni affinity chromatography



A: 共转化pACYCDuet-mcs1Ego1与pRSFDuet-mcs1Ego3后诱导表达, Ni柱纯化Ego1/Ego3复合物的SDS-PAGE分析图。M: 蛋白marker; WCL: 全菌裂解液; P: 沉淀; SUP: 上清; FT: 流过液; 40、110、200: 咪唑浓度(mmol/L); B: Ni柱纯化的Ego1/Ego3复合物, 进行凝胶排阻层析纯化后SDS-PAGE分析图。M: 蛋白maker; 32、34、37~41: 蛋白洗脱峰位置的管数; C: Ego1/Ego3复合物的凝胶排阻层析纯化曲线图。

A: SDS-PAGE of Ni affinity purified the co-expressed Ego1 and Ego3 protein by inducing a co-transformed *E. coli* BL21(DE3) with pACYCDuet-mcs1Ego1 and pRSFDuet-mcs1Ego3. M: marker; WCL: whole cell lysis; P: precipitate; SUP: supernatant; FT: flow through; 40, 110, 200: concentration of imidazole buffer (mmol/L); B: SDS-PAGE of gel-filtration purified the Ego1/Ego3 complex. M: maker; 32、34、37~41: the number of tubes in the gel-filtration peak; C: gel-filtration chromatography of purified Ego1/Ego3 complex.

图3 两个质粒共转化后诱导表达的Ego1/Ego3蛋白复合物纯化结果图
Fig.3 The purified Ego1/Ego3 complex using a co-transformation strategy

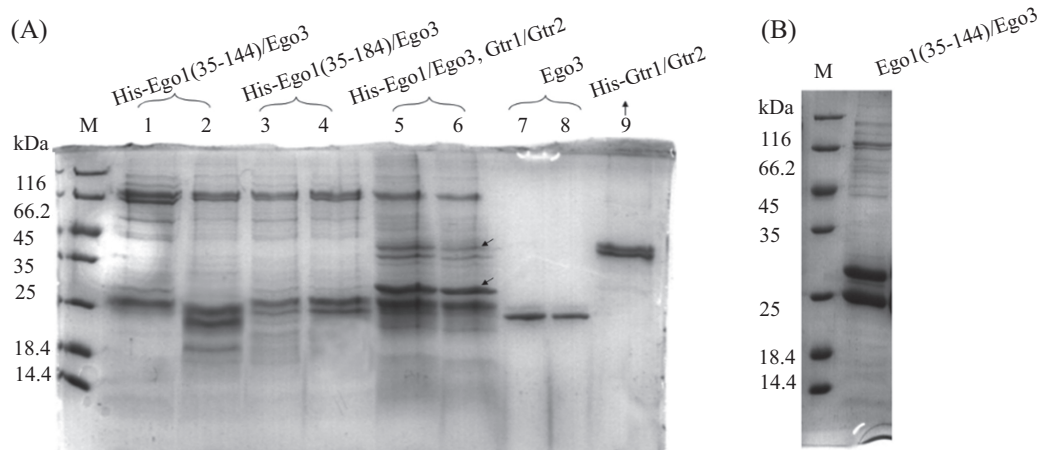
Ego3分别单独转化*E. coli* BL21(DE3), 诱导表达后, 共破菌来纯化EGO复合物, 结果见图4A。该共破菌纯化方法显示, His-Ego1/Ego3复合物虽能pull down重组表达的无标签的Gtr1/Gtr2, 获得EGO复合物, 但得到的复合物中Gtr1/Gtr2蛋白量明显低于Ego1/Ego3复合物。这一结果表明, 在该纯化条件下, 虽然Gtr1/Gtr2与Ego1/Ego3复合物存在相互作用, 但这两个复合物间相互结合相对并不强, 形成的EGO复合物未能有效改善Ego1蛋白的降解现象。

2.5 截短的Ego1蛋白和Ego3共表达及纯化 为了研究生物信息学分析结果中Ego1蛋白的N-端coil区域和C-端coil区及螺旋区对形成蛋白质高级结构以及其结合Ego3的影响, 研究中构建了一系列N端带6His的分别截短N-端和C-端的Ego1亚克隆与Ego3全长构成双元载体表达框架, 构建的表达载体包括pRSFDuet-Ego1(18-184)-Ego3、pRSFDuet-Ego1(35-184)-Ego3、pRSFDuet-Ego1(35-144)-Ego3、

pRSFDuet-Ego1(35-100)-Ego3。通过共表达、纯化系统来确定能稳定存在的并结合Ego3的Ego1截短蛋白核心区段。结果发现, 在分别截短N-端氨基酸的Ego1(14, 18, 35-184), 以及N-端和C-端均截短的Ego1(35-144)都获得了重组表达和结合全长Ego3蛋白, 且N-端截短35个氨基酸Ego1(35-184), 能明显改善蛋白降解现象(部分结果见图4A)。因此, 后期研究中使用pRSFDuet-mcs1Ego1(35-184)与pACYDuet-mcs1Ego3两个不同抗性质粒共转化*E. coli*, 诱导共表达, 可纯化到相对稳定的复合物(图4B)。

3 讨论

TORC1信号转导通路广泛存在于真核生物体内, 对细胞生长和代谢起到中枢调控作用, 其主要接收并整合包括生长因子、营养水平、能量状态、环境压力等多种细胞内外信号, 通过控制蛋白质翻译、核糖体合成及细胞自噬来协调细胞的生长与增殖过



A: SDS-PAGE分析复合物中各亚基蛋白相互作用图。M: 蛋白marker; 1: Ego1(35-144)结合Ego3后40 mmol/L咪唑洗脱; 2: Ego1(35-144)结合Ego3后200 mmol/L咪唑洗脱; 3: Ego1(35-184)结合Ego3后40 mmol/L咪唑洗脱; 4: Ego1(35-184)结合Ego3后200 mmol/L咪唑洗脱; 5、6: pull down纯化EGOC复合物各亚基, 分别为His-Ego1/Ego3和Gtr1/Gtr2; 7~8: 纯化的Ego3蛋白; 9: 纯化的His-Gtr1/Gtr2蛋白复合物; B: SDS-PAGE分析通过共转化pRSFDuet-mcs1Ego1(35-184)和pACYDuet-mcs1Ego3后诱导表达、纯化获得的较稳定Ego1(35-184)/Ego3复合物图。

A: SDS-PAGE analysis of protein interaction existing in EGO complex. M: marker, 1: the truncated Ego1 (35-144) binding of Ego3 was eluted with 40 mmol/L imidazole buffer; 2: the truncated Ego1 (35-144) binding of Ego3 was eluted with 200 mmol/L imidazole buffer; 3: the truncated Ego1 (35-184) binding of Ego3 was eluted with 40 mmol/L imidazole buffer; 4: the truncated Ego1 (35-184) binding of Ego3 was eluted with 200 mmol/L imidazole buffer; 5,6: co-purified EGO complex by pull down, showing His-Ego1/Ego3 and Gtr1/Gtr2; 7,8: purified Ego3 protein; 9: purified His-Gtr1/Gtr2 protein complex; B: SDS-PAGE of purified a stable truncated Ego1 (35-184)/Ego3 complex by using co-transformation of pRSFDuet-mcs1Ego1(35-184) and pACYDuet-mcs1Ego3.

图4 EGO亚基间相互作用分析和纯化的Ego1(35-184)/Ego3稳定复合物SDS-PAGE图

Fig.4 SDS-PAGE analysis of interaction of EGO subunits and purified stable Ego1 (35-184)/Ego3 complex

程。营养因子如氨基酸作为细胞生长和增殖的重要基础, 感受其在细胞内的水平对于TORC1正确发挥功能至关重要。不同于TORC1通路中其他信号, 对于氨基酸调控TORC1信号转导过程的认识一直非常有限^[4]。EGO复合物作为酿酒酵母(*S. cerevisiae*)中的哺乳动物Regulator类似物, 在细胞TORC1信号转导通路感受氨基酸丰度信号、激活细胞生长代谢相关调控基因方面发挥重要作用。酵母EGO复合物构成亚基Ego1和Ego3作为定位在细胞内体膜表面的支架蛋白, 在氨基酸信号级联传导过程中被认为可通过结合异源二聚体Gtr1/Gtr2 GTPases, 对多蛋白复合物TORC1的正确亚细胞靶向定位和最终激活起到关键作用。

先前很多研究表明, 在*E. coli*中进行多个蛋白同时表达常常可以提高目的蛋白产量和可溶性, 甚至活性。此外, 进行多蛋白重组共表达也常被用来研究蛋白的相互作用、蛋白复合物的形成以及信号传导^[23]。因此, 本研究对酵母Ego1与Ego3基因进行了克隆, 构建了双T7启动子的双元原核表达载体。通过在大肠杆菌中共表达、共破菌, 以及带有不同抗性的两个质粒共转化的方法来重组表达Ego1/Ego3复合物。T7噬菌体启动子具有高度的特异性, 只有

T7 RNA聚合酶才能使其启动, 许多外源终止子都不能有效地终止T7 RNA聚合酶, 因此它可以高效表达其他系统不能有效表达的基因^[24]。在本研究中, 利用双T7启动子的双元载体重组共表达的Ego1与Ego3蛋白在*E. coli*中形成可溶性的复合物, 并通过亲和层析纯化, 验证了Ego1与Ego3间存在强的蛋白相互作用。但获得的纯化蛋白比例存在明显差异, 之后在交换多克隆位点的插入基因后, 发现纯化复合物中Ego1与Ego3蛋白量差异并不是各自基因的表达水平差异造成的, 推测这一结果可能是由两蛋白间相互作用的不稳定性所致。相比哺乳动物氨基酸信号传递中与异源二聚体Rag GTPases结合的Regulator复合物由五个蛋白亚基构成, 酵母中结合Rag同源Gtr异源二聚体的EGO复合物亚基只发现了Ego1和Ego3。目前我们的结果证实, 虽然Ego1和Ego3存在强的相互作用, 但很有可能需要其他因素来稳定Ego1/Ego3复合物。在研究中也试图共表达、纯化EGO复合物目前已知的四个亚基来改善Ego1/Ego3复合物稳定性, 但纯化的复合物中蛋白亚基的比例差异显著, 表明Ego1/Ego3复合物与异源二聚体Gtr1/Gtr2相互作用相对较弱。同样, 在对哺乳动物Regulator复合物进行鉴定时, 发现缺失任何亚基都

会影响到其自身及与Rag蛋白相互作用的稳定性^[14]。另一方面也有研究显示, Rag复合物中两成员各自所携带的鸟苷状态直接影响其与Raptor的亲合力, 推测细胞内氨基酸水平可能以某种机制影响Rag(Gtr)复合物所载鸟苷的状态, 进而影响其与结合蛋白间亲和力的强弱, 从而调控TORC1的活性^[13]。基于本研究的结果, 提示对酵母细胞内的EGO复合物构成亚基进一步鉴定是非常必要的。而获得该复合物成员的高分辨率的结构信息将有助于进一步揭示多种功能或机制背后的分子基础。研究中, 我们通过构建一系列带组氨酸标签截短的Ego1与全长Ego3共表达, 依靠pull down纯化来鉴定Ego1与Ego3相互作用的区段。最终, 发现共转化pRSFDuet-Ego1(35-184)和pACYDuet-Ego3可表达、纯化到稳定且比例较一致的复合物, 从而为进一步对Ego1/Ego3蛋白复合物进行生化鉴定和结构生物学研究奠定了基础。

参考文献 (References)

- Martin DE, Hall MN. The expanding TOR signaling network. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 158-66.
- Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immol/Lunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 1991; 253(5022): 905-9.
- 蒋伶活, 闫智慧. 酵母TOR信号转导途径. *细胞生物学杂志 (Jiang Linghuo, Yan Zhihui. TOR signaling pathway in yeast. Chinese Journal of Cell Biology)* 2007; 29(4): 478-82.
- 高源, 吴更. mTORC1通路中氨基酸信号转导相关机制研究进展. *中国细胞生物学学报 (Gao Yuan, Wu Geng. Advances in the mechanisms of amino acid signaling in mTORC1 pathway. Chinese Journal of Cell Biology)* 2012; 34(8): 812-8.
- Loewith R, Jacinto E, Wullschlegel S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, *et al.* Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 2002; 10: 457-68.
- Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors and stress. *Mol Cell* 2010; 40: 310-22.
- Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): An integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 2004; 23: 3151-7.
- 王志钢, 吴应积, 旭日干. mTOR信号通路与细胞生长调控. *生物物理学报 (Wang Zhigang, Wu Yingji, Xu Rigan. The mTOR signaling pathway and the regulation of cell growth. Acta Bio-*
- physica Sinica)* 2007; 23: 333-42.
- Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12: 21-35.
- 郑杰. mTOR信号途径与肿瘤. *生命科学 (Zheng Jie. mTOR signaling pathway and cancer. Chinese Bulletin of Life Sciences)* 2006; 18(3): 261-5.
- Sekiguchi T, Hirose E, Nakashima N, Ii M, Nishimoto T. Novel G proteins, Rag C and Rag D, interact with GTP-binding proteins, RagA and RagB. *J Biol Chem* 2001; 276(10): 7246-57.
- Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol* 2008; 10(8): 935-45.
- Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, *et al.* The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 2008; 320(5882): 1496-501.
- Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 2010; 141(2): 290-303.
- Bar-Peled L, Schweitzer LD, Zoncu R, Sabatini DM. Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell* 2012; 150(6): 1196-208.
- Panchaud N, Péli-Gulli MP, De Virgilio C. SEACing the GAP that nEGOCiates TORC1 activation: Evolutionary conservation of Rag GTPase regulation. *Cell Cycle* 2013; 12(18): 2948-52.
- Bonfils G, Jaquenoud M, Bontron S, Ostrowicz C, Ungermann C, De Virgilio C. Leucyl-tRNA synthetase controls TORC1 via the EGO complex. *Mol Cell* 2012; 46(1): 105-10.
- Zhang T, Péli-Gulli MP, Yang H, De Virgilio C, Ding J. Ego3 functions as a homodimer to mediate the interaction between Gtr1-Gtr2 and Ego1 in the ego complex to activate TORC1. *Structure* 2012; 20(12): 2151-60.
- Kim J, Guan KL. Amino acid signaling in TOR activation. *Annu Rev Biochem* 2011; 80: 1001-32.
- Jones DT. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* 1999; 292: 195-202.
- Aslanidis C, de Jong PJ. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res* 1990; 18(20): 6069-74.
- James M, Mirosław M. Interactions between kinase scaffold MP1/p14 and its endosomal anchoring protein p18. *Biochem* 2011; 50(18): 3696-705.
- Tolia NH, Joshua-Tor L. Strategies for protein coexpression in *Escherichia coli*. *Nat Methods* 2006; 3(1): 55-64.
- 徐友强, 马翠卿, 陶飞, 许平. 细菌启动子识别及应用研究进展. *生物工程学报 (Xu Youqiang, Ma Cuiqing, Tao Fei, Xu Ping. Bacterial promoter recognition and application. China Journal Biotechnology)* 2010; 26(10): 1393-403.