

酿酒酵母Afr1p调控septin蛋白Cdc12p的定位

祝嫦巍^{1,2*} 熊明勇²

(¹安徽科技学院生命科学学院, 凤阳 233100; ²天津大学化工学院分子与细胞生物学实验室, 天津 300072)

摘要 *AFR1*最初被鉴定为在过量表达的情况下, 可以使细胞产生 α 因子抗性, 同时对融合过程中融合突起的形成起重要作用。Afr1p还具有调节细胞壁完整性途径中的MAPK Mpk1p的定位及活性的功能。该文通过对蛋白定位的观察发现, 半乳糖诱导*GAL-AFR1*过量表达破坏了在出芽过程中Cdc12p的定位; 缺失*AFR1*也会导致Cdc12p定位异常。Western blot结果显示, 在营养生长过程中Afr1p稳定表达。这说明, 稳定表达的*AFR1*有调节septin Cdc12p定位的功能, 从而对维持septin的结构起到一定的作用。

关键词 Afr1p; Cdc12p; 定位; 酿酒酵母

Afr1p Regulates the Localization of Septin Cdc12p in *Saccharomyces cerevisiae*

Zhu Changwei^{1,2*}, Xiong Mingyong²

(¹College of Life Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China; ²Department of Biochemical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, TianJin University, Tianjing 300072, China)

Abstract *AFR1* is firstly identified to promote α -factor resistance when overexpressed. It also has an important role in promoting shmoo formation during mating. Afr1p regulates the localization and activity of the Mpk1p MAP kinase in the cell wall integrity pathway. Here, we showed that galactose-induced overexpression of *AFR1* might interrupte the proper localization of Cdc12p, and deletion of *AFR1* also cause mislocalization of Cdc12p in budding cells. The result of Western blot indicated that the expression of Afr1p was at a constant level during vegetative growth. These results suggest that *AFR1* is required for the localization of septin Cdc12p and regulates the septin architecture in *Saccharomyces cerevisiae*.

Key words Afr1p; Cdc12p; localization; *Saccharomyces cerevisiae*

酿酒酵母有五条MAPK信号转导通路, 响应各种信号, 调控细胞生长分化^[1]。当单倍体酵母细胞暴露于由相反交配型的细胞分泌的交配信息素中时, 由Ste11p(MEKK)、Ste7p(MEK)、Fus3p和Kss1p(MAPK)组成的MAPK级联反应信息素信号响应途径(pheromone response pathway)将被激活, 导致细胞周期停滞在G₁期, 细胞开始极化生长, 形成融合突起, 各种细胞融合和核融合所需的蛋白大量表达^[2]。

1993年, Konopka^[3]利用质粒过表达的方法首先鉴定了*AFR1*基因。在a型细胞中过量表达*AFR1*基因, 细胞会适应由交配信息素 α 因子诱导产生的细胞周期停滞, 产生 α 因子抗性(α -factor resistance), 从而跨过G₁期的细胞周期停滞, 进入生长状态。除了过量表达使细胞对 α 因子产生抗性外, Afr1p还对融合过程中融合突起的形成起到重要作用^[3-4]。*afr1Δ*菌株不能形成尖的融合突起, 只有59%的几丁

收稿日期: 2014-02-28 接受日期: 2014-04-29

国家自然科学基金(批准号: 31100070)和安徽省自然科学基金(批准号: 1408085MC41)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0550-6733129, E-mail: zhucw@ahstu.edu.cn

Received: February 28, 2014 Accepted: April 29, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31100070) and the Anhui Provincial Natural Science Foundation (Grant No.1408085MC41)

*Corresponding author. Tel: +86-550-6733129, E-mail: zhucw@ahstu.edu.cn

网络出版时间: 2014-07-21 10:06 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.08.0060.html>

质能形成高度极化状态。*afr1Δ*菌株中90%的肌动蛋白是可以极化分布的,但不能在集中融合突起的顶端^[4]。

在信息素诱导的条件下, Afr1p定位在细胞融合突起的基部^[4]。用半乳糖诱导*GAL10-AFR1*, 观察在细胞出芽过程中的定位, 发现Afr1p定位在母细胞-子细胞的颈部(bud neck)^[3,5]。而这一位置也是septin蛋白所在的位置。进一步的实验发现, 半乳糖诱导*GAL10-AFR1*过量表达导致的细胞形态与septin蛋白温度敏感突变株在非许可条件下的形态相似, 都形成长芽(elongated bud)^[4]。双杂交实验表明, Afr1p与septin Cdc12p相互作用^[4], Afr1p的第350~474个氨基酸是与Cdc12p相互结合所必需的^[5]。

*CDC12*是一个必需基因, 属septin家族的一员。在酿酒酵母中与其他三种septin蛋白Cdc3p、Cdc10p、Cdc11p相互结合, 组成septin环(septin ring), 定位在出芽细胞的颈部, 参与胞质分裂。septin是一类保守蛋白, 具有GTP酶活性, 最早在酿酒酵母中发现, 后来在其他真菌和各种动物细胞包括人类(human)、小鼠(mouse)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)和线虫(*Caenorhabditis elegans*)中发现。在很多物种中, septin参与胞质分裂^[6-7]。酿酒酵母中的4种septin基因(*CDC3*、*CDC10*、*CDC11*和*CDC12*)最初通过温度敏感突变株被鉴定^[8-9], 参与胞质分裂。另外, septin还参与轴向出芽位置的选择^[10]、细胞形态变化^[11]和细胞极化生长^[12]等。

酵母双杂交的实验结果表明, Afr1p与Cdc12p直接作用, 但Afr1p在这个过程中作用还不知道。本文通过对蛋白定位的观察以及Western blot的实验结果, 推测细胞中Afr1p的稳定表达调节septin Cdc12p的定位, 从而对维持septin的结构起到一定的作用。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养条件

酵母菌株在30 °C YPD培养基中培养, 含有质粒的菌株在缺失相应氨基酸的合成培养基中培养。大肠杆菌(*Escherichia coli*) TOP10用以扩增质粒, 37 °C LB培养基中培养。本实验中使用的酿酒酵母YZCW308A作为野生型菌株, YZCW306A为*afr1Δ*菌株, 详细基因型参见参考文献[13]。

半乳糖诱导培养: 菌株首先在普通培养基中培养过夜, 将过夜培养的细胞离心收集, 无菌水洗3次以去除残留葡萄糖。取 1×10^7 的细胞转接入5 mL半乳糖培养基(半乳糖替代葡萄糖, 其他成分相同)中培养, 定时取样观察。

1.2 质粒的构建

本实验所用质粒见表1, 所用的引物见表2。

质粒构建过程如下。*GAL-AFR1-GFP*质粒的构建: 使用引物cAFR1-U和cAFR1-D扩增*AFR1*基因的ORF部分, 用*Kpn* I和*Bam*H I酶切连接到质粒pYES2上, 构建*GAL-AFR1*质粒; 使用引物GFPS65T-U和GFPS65T-D扩增GFP, 用*Bam*H I酶切连接到上述质粒, 构建*GAL-AFR1-GFP*质粒。

YCplac22-*CDC12-GFP*质粒的构建: 使用引物cCDC12-U和cCDC12(2201)-D, 以及cCDC12(2222)-U

表1 本实验所用引物质粒
Table 1 Plasmids used in this study

质粒名称 Plasmid name	来源 Source	筛选标记 Marker
<i>GAL-AFR1</i>	This study	Amp ^r <i>URA3</i>
<i>GAL-AFR1-GFP</i>	This study	Amp ^r <i>URA3</i>
YCplac22- <i>CDC12-GFP</i>	This study	Amp ^r <i>TRP1</i>
YCplac22- <i>AFR1-HA</i>	Reference [14]	Amp ^r <i>TRP1</i>

表2 本试验所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
cAFR1-U	G G G C C C G G T A C C T G G A G G G C T C A T C A T C T A T C
cAFR1-D	G G G C C C G G A T C C A A T T A A A T A T G T G T A A A G C
GFPS65T-U	C C C G G G G G A T C C A A C A G T A A A G G A G A A G A A C T T T T C
GFPS65T-D	C C C G G G G G A T C C T T T G T A T A G T T C A T C C A T G C C A T G
cCDC12-U	C C C G G G G A A T T C T A A C G C C A A G T C T G G T T C A G
cCDC12(2201)-D	C C C G G G G G A T C C T T T T A A A T G G A T T T T T T A C
cCDC12(2222)-U	C C C G G G G G A T C C T G A T G A T T A A T A A T G T C T T
cCDC12-D	C C C G G G C T G C A G T G C A G A C G T A C C T A A G T G

和cCDC12-D分别扩增*CDC12*基因-401 bp~1 221 bp和1 222 bp~1 441 bp的核苷酸序列,分别使用*EcoR* I/*Bam*H I、*Bam*H I、*Bam*H I/*Pst* I将各个核苷酸片段连入质粒YCplac22构建而成。

1.3 显微观察

显微和GFP荧光观察使用奥林巴斯BX51显微镜。使用100倍物镜和不同的滤镜进行微分干涉(DIC)和荧光显微观察。使用SPOT CCD(Diagnostic instruments公司)照相机拍摄图片。每次实验计数不少于200个细胞,计算GFP正确定位的细胞数量,用百分数表示。

1.4 Western blot分析

在不同条件下收集细胞,于-80 °C保存。整个免疫印迹分析过程,包括细胞收集、裂解、电泳、转膜参见分子克隆。使用Santa Cruz公司的抗HA的单克隆抗体检测HA信号。使用Cdc28p做内参,其表达水平用Cell Signaling公司的Cdc2多克隆抗体检测。

2 结果

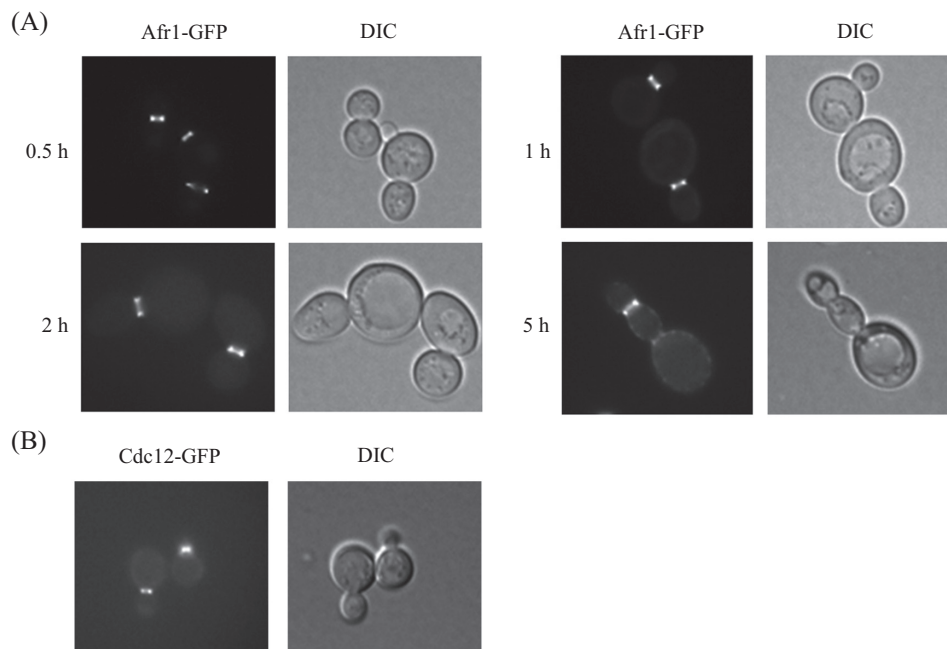
2.1 *GAL-AFR1-GFP*在细胞有丝分裂过程中的定位

在 α 因子诱导的条件下,*AFR1*的表达水平升高,但在有丝分裂过程中表达水平很低,不能观察到

*Afr1-GFP*在营养生长细胞中的定位。我们利用半乳糖启动子*GAL1*,在半乳糖诱导的条件下观察*Afr1p*在细胞出芽过程中的定位。分别在半乳糖诱导培养0.5, 1, 2, 5 h取样观察,结果如图1A。如前所述,半乳糖诱导*GAL-AFR1*过量表达可以导致细胞形成长芽结构。图1A中可以看出,在半乳糖诱导初期0.5 h和1 h,细胞仍为椭圆形状,芽体形状基本正常,此时可以观察到*Afr1p*定位在出芽细胞颈部。这种定位状态与septin蛋白Cdc12p在营养生长过程中的定位非常类似(图1B)。在半乳糖诱导2 h后,细胞开始形成长芽,但*Afr1p*仍定位在细胞颈部;诱导培养5 h后,细胞出现更长的芽,我们可以看见在进一步形成的长芽中,*Afr1p*除了在细胞颈部的定位外,在芽的前端也可以看到*Afr1p*的定位。

2.2 *CDC12-GFP*在半乳糖诱导的*GAL-AFR1*细胞中的定位

半乳糖诱导*GAL-AFR1-GFP*在细胞有丝分裂过程中的定位与Cdc12p的定位类似,下面的实验我们观察了Cdc12p在半乳糖诱导的*Gal-AFR1*细胞中的定位情况,即观察在形成长芽的细胞中Cdc12p的定位情况。在YZCW308A菌株中共转入质粒YCplac22-*CDC12-GFP*和*GAL-AFR1*,在半乳糖诱导的条件下,分别在0, 2, 12 h取样观察,结果如图2。



A: 半乳糖诱导*GAL-AFR1-GFP*在细胞中的定位; B: Septin Cdc12p在出芽过程中的定位。

A: the localization of *GAL-AFR1-GFP* under galactose induction; B: the localization of Septin Cdc12p while budding.

图1 *GAL-AFR1-GFP*与Cdc12-GFP在细胞中的定位

Fig.1 The localization of *GAL-AFR1-GFP* and Cdc12-GFP

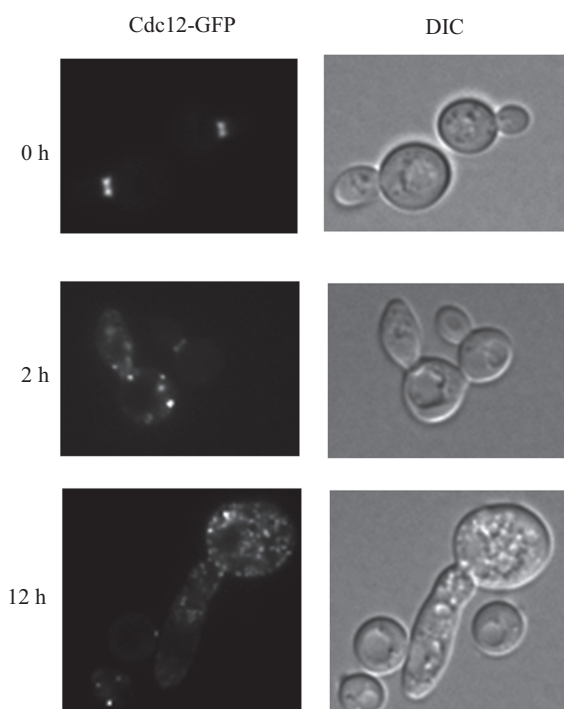


图2 半乳糖诱导下单拷贝质粒中Cdc12p在*GAL-AFR1*细胞中的定位

Fig.2 The localization of Cdc12p in YCp vector in *Gal-AFR1* cells under galactose induction

细胞在半乳糖诱导前Cdc12p可以正确定位在出芽细胞的颈部; 在加入半乳糖诱导2 h后, 细胞中Cdc12p的定位逐渐消失, 只有不到10%的细胞中Cdc12p可以定位在出芽细胞的颈部; 在更长时间的诱导后, 整个细胞中都可见GFP的信号, 但却完全不能定位。这说明, 半乳糖诱导*Gal-AFR1*过量表达破坏了Cdc12p的定位, 进而可能影响到其功能的发挥, 导致细胞出现长芽。

2.3 Cdc12-GFP在*afr1Δ*菌株中的定位

过量表达*AFR1*破坏Cdc12p在细胞中的定位, 进一步的研究发现, 缺失*AFR1*也导致Cdc12p定位异常(图3)。我们观察到Cdc12p在>98%的野生型细胞中可以正确定位; 在*afr1Δ*菌株中不到15%的Cdc12p可以正确定位, 而且即使在Cdc12p能够正确定位的细胞中, GFP的信号也要弱于野生型菌株中的信号。

2.4 Afr1p在营养生长过程中的表达水平

过量表达*AFR1*导致细胞形成长芽, 在形成长芽的细胞中septin Cdc12p定位被破坏。更有趣的是, 缺失*AFR1*也导致Cdc12p定位异常。即*AFR1*过量和缺失都会导致Cdc12p定位异常。因此, 推测Afr1p的表达水平对其功能的执行至关重要。我们使用

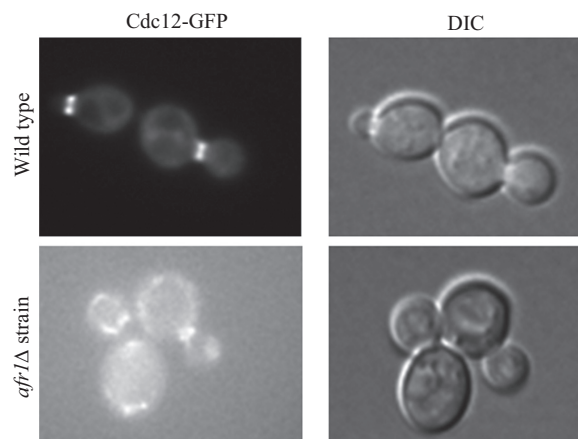


图3 出芽过程中Cdc12p在野生型菌株和*afr1Δ*菌株中的定位

Fig.3 The localization of Cdc12p in wild type and *afr1Δ* strain while budding

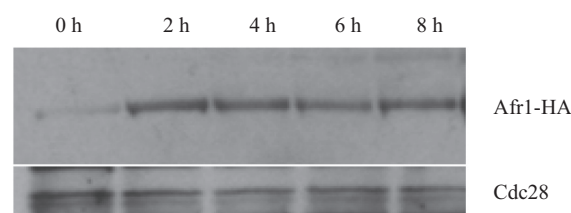


图4 在营养生长过程中Afr1p的表达

Fig.4 Afr1p level in vegetative growth

Western blot检测了在营养生长过程中Afr1p的表达水平(图4), 结果显示, 在营养生长过程中Afr1p稳定表达, 0 h检测到较弱的信号, 2~8 h Afr1p在同一水平稳定表达。

3 讨论

过量表达*AFR1*可以使细胞产生 α 因子抗性, 适应由交配信息素诱导产生的细胞停滞, 进入生长状态; *afr1Δ*菌株融合突起形成缺陷^[3-5]。因此, 最初关于*AFR1*功能的研究主要集中在细胞融合及相应的细胞形态变化。但在目前的研究中还有一些现象无法解释, 例如过量表达*AFR1*细胞会产生对 α 因子的抗性, 但缺失*AFR1*并没有导致细胞对 α 因子敏感性的提高; 虽然*afr1Δ*菌株的融合突起形成有缺陷, 但融合效率没有降低^[3-4]。Xiong等^[14]发现, 信息素响应途径的激活不依赖于*AFR1*, 这说明过量表达*AFR1*产生的 α 因子抗性不是直接作用于该途径, 而是通过其他途径起作用。进一步的实验证明, Afr1p具有调节另一条MAPK途径细胞壁完整性途径(cell wall integrity pathway)的功能, 不仅在融合突起形成过程中具有调节Mpk1p的定位及活性的功能^[13-14], 在

高渗和热激的条件下也介导Mpk1p的活性^[14]。这说明, Afr1p的功能可能不仅限于细胞融合过程。而Western的结果显示, Afr1p在营养生长过程中在同一水平稳定表达, 也说明Afr1p在营养生长过程中执行重要的功能。

酵母双杂交的实验结果表明, Afr1p与Cdc12p直接作用^[5], 但在这个过程中Afr1p的功能还不知道。虽然在营养生长过程中我们很难检测到Afr1-GFP的定位信号, 但半乳糖诱导AFR1过量表达, 我们可以看到Afr1p与Cdc12p的定位类似, 均定位在出芽细胞的颈部。随着诱导时间的延长, 过量表达的Afr1p可能占据了Cdc12p的位置, Cdc12p的定位被破坏, 导致细胞形成长芽。而更有趣的事情是缺失AFR1也会导致septin定位异常。这说明Afr1p直接或间接参与septin的定位和结构的形成, 而且AFR1在细胞内少量的稳定表达对其功能的发挥起到重要作用。Afr1p与septin Cdc12p相互作用, 而Cdc12p与其他几种septin蛋白相互结合, 在细胞周期进程、细胞的形态变化、胞质分离中起到重要作用^[15-16], 这也暗示我们, 除了上述功能, AFR1还具有其他的功能值得我们去深入研究。

参考文献 (References)

- Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, Davenport K. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62(4): 1264-300.
- Bardell L. A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* 2005; 26(2): 339-50.
- Konopka JB. AFR1 acts in conjunction with the alpha-factor receptor to promote morphogenesis and adaptation. *Mol Cell Biol* 1993; 13(11): 6876-88.
- Konopka JB, DeMattei C, Davis C. AFR1 promotes polarized apical morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1995; 15(2): 723-30.
- Giot L, Konopka JB. Functional analysis of the interaction between Afr1p and the Cdc12p septin, two proteins involved in pheromone-induced morphogenesis. *Mol Biol Cell* 1997; 8(6): 987-98.
- Longtine MS, DeMarini DJ, Valencik ML, Al-Awar OS, Fares H, De Virgilio C, *et al.* The septins: Roles in cytokinesis and other processes. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8(1): 106-19.
- Field CM, Kellogg D. Septins: Cytoskeletal polymers or signalling GTPases? *Trends Cell Biol* 1999; 9(10): 387-94.
- Hartwell LH, Culotti J, Reid B. Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970; 66(2): 352-9.
- Hartwell LH. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res* 1971; 69(2): 265-76.
- Madden K, Snyder M. Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu Rev Microbiol* 1998; 52: 687-744.
- Cid VJ, Adamiková L, Cenamor R, Molina M, Sánchez M, Nombela C. Cell integrity and morphogenesis in a budding yeast septin mutant. *Microbiol* 1998; 144(Pt 12): 3463-74.
- Schneider C, Grois J, Renz C, Gronemeyer T, Johnsson N. Septin rings act as a template for myosin higher-order structures and inhibit redundant polarity establishment. *Cell Sci* 2013; 126(Pt 15): 3390-400.
- Changwei Z, Mingyong X, Ranran W. Afr1p has a role in regulating the localization of Mpk1p at the shmoo tip in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 2007; 581(14): 2670-2674.
- Xiong M, Wang J. Afr1p mediates activation of the Slr2p MAP kinase induced by pheromone, heat shock and hypo-osmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 2010; 10(2): 150-7.
- Mostowy S, Cossart P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13(3): 183-94.
- Oh Y, Bi E. Septin structure and function in yeast and beyond. *Trends Cell Biol* 2011; 21(3): 141-8.