

高渗透压甘油信号转导途径

阮海华 李西川 兰 蓓 蒋伶活*

(天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

摘要 高渗透压甘油(HOG)途径是经典的 MAPK 级联系统之一, 对酵母细胞在高渗透压条件下的生长是必需的。阐述了 HOG 信号途径的研究进展及其各组分在 HOG 途径中的调节作用和功能。对真核细胞研究模型酵母菌感受高渗透压环境的胞内信号转导机制的研究, 为人们深入了解哺乳动物和植物细胞如何应对环境胁迫打下了基础。

关键词 酿酒酵母菌; 信号转导; MAPK 级联; 高渗透压甘油途径

在长期的进化过程中, 生物已经形成了精确而敏感的适应机制, 使其能够准确地感受周围环境的变化并激活胞内信号转导途径, 进而对外界环境刺激作出适当的应答。MAPK 级联系统是细胞适应外界环境变化的一种非常重要的调控机制。MAPK 级联系统由三种蛋白激酶组成: MAPK, MAPKK (MAPK kinase)和 MAPKKK (MAPKK kinase)。被其上游因子激活的 MAPKKK 可以磷酸化并激活 MAPKK, 被激活的 MAPKK 接着磷酸化并激活 MAPK, 被激活的 MAPK 进而磷酸化并激活下游的转录因子, 从而 MAPK 级联系统将外界信号一级一级地传递到细胞核内, 细胞因此可以对外界信号进行应答^[1]。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞中至少存在 5 个 MAPK 级联系统, 它们由 5 种 MAPK 蛋白激酶: Mpk1, Smk1, Fus3, Kss1 和 Hog1 控制, 分别与细胞壁结构完整性, 孢子分化, 菌丝形成和侵入生长, 细胞接合以及高渗透压甘油形成(high osmolarity glycerol, HOG)过程有关^[2, 3]。本文将仅对其中的 HOG MAPK 级联系统及其信号途径中各组分的功能和亚细胞定位的研究进展进行详细阐述。

1 酵母 HOG 信号转导途径的组成及调控

HOG 途径对于酵母在高渗透条件下的生长是必需的。酵母细胞为了应对高盐等高渗透压环境条件, 通常通过在细胞内合成和贮存甘油来提高细胞内部的渗透压, 从而保持细胞内的水分含量, 以利于细胞的正常生理代谢^[4]。这一信号转导过程是由 HOG MAPK 级联途径控制的。HOG MAPK 级联的核心分子为 MAPK Hog1, 它是由其上游的蛋白激

酶 MAPKK Pbs2 来激活的。Pbs2 则可以被其上游的 Ssk2 或 Ssk22 (Ssk2 的同工蛋白)和 Ste11 这两种不同的 MAPKKK 所磷酸化和激活(图 1)。Ssk2 和 Ste11 分别由两个不同的上游分支途径控制。其中一条分支途径是由跨膜蛋白 Sln1 感受外界的高渗透压信号, 并将信号通过 Ypd1 和 Ssk1 转到 Ssk2 或 Ssk22。另一条途径是由跨膜蛋白 Sho1 感受高渗透压信号, 然后通过未知的因子激活 Cdc42, Cdc42 进而通过 Ste20 激活 Ste11 (图 1)。其中任意一条分支途径被激活均可引起 Hog1 的 Thr174 和 Tyr176 残基双重磷酸化, 并导致 Hog1 从细胞质向细胞核内转移。在细胞核中 Hog1 进而激活 Hot1, Msn2/Msn4, Sko1 和 / 或 Smp1 等转录因子, 这些转录因子从而调控甘油形成所需基因的表达, 以便于甘油的产生。甘油的过量表达对细胞也是有害的, 因此细胞中的蛋白磷酸酯酶(protein phosphatases) Ptp2、Ptc1、Ptc2 和 Ptc3 可以对磷酸化的 Hog1 进行去磷酸化, 从而降低 Hog1 的活性以达到对甘油合成量的控制。通过对 Hog1 活性的合理调控, 由此细胞就可以合成所需的甘油量, 以应对外界渗透压的变化^[5]。

1.1 SLN1 与 SHO1 途径

酿酒酵母细胞膜上存在两种跨膜渗透压感受器: Sln1 和 Sho1。它们能够独立地调控渗透压胁迫条件下 HOG 途径的激活, 这两支上游途径分别被称为 SLN1 和 SHO1 途径。Sln1 是细菌双组分信号转导物的同源物, 具有两个跨膜区域和一个胞内组

收稿日期: 2006-01-11 接受日期: 2006-06-09

国家自然科学基金(No.30571047)和博士后科学基金(No.2005037524)资助项目

* 通讯作者。Tel: 022-27402527, E-mail: linghuojiang@yahoo.com.cn

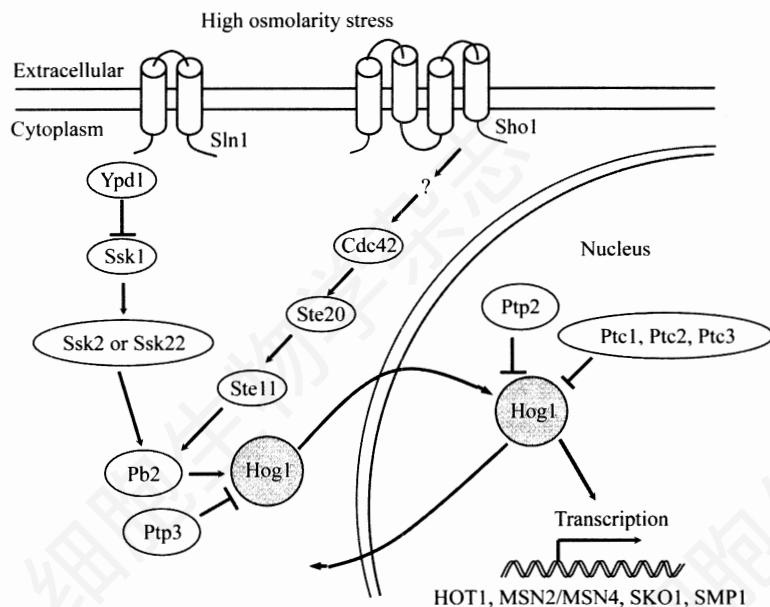


Fig.1 Diagram showing the HOG pathway and its components

⊥ represents inhibition; → represents activation.

氨酸激酶(histidine kinase, HK)结构域。在正常或低渗透压条件下, Sln1 均匀地分布在细胞膜上, Sln1 的组氨酸激酶活性催化自身的一个组氨酸残基磷酸化, 该磷酸基团可以从该组氨酸残基转移到 Sln1 C 末端的受体结构域(Rec) 1144 位的天冬氨酸残基上, 该磷酸基团继续传递给磷酸基团携带中间体蛋白, Ypd1 的 64 位组氨酸残基, 并最终传递给调控蛋白 Ssk1 和 Skn7 的天冬氨酸残基^[6](图2)^[7]。Ypd1 的 α A、 α B、C 螺旋结构环绕包围磷酸化位点 His64 与 Sln1 的 α 1 螺旋以及 4 个突出的环形成互补的表面, 使得在空间上 His64 与 Sln1 的活性位点 Asp1144 距离最近, 为磷酸基团的转移提供空间结构^[8]。Ssk1 的磷酸化阻止了 Ssk1 与其下游的 MAPKKK Ssk2 (或 Ssk22)之间的互动, 因此 Ssk2 或 Ssk22 处于非活性状态^[9]。

在高渗透压胁迫条件下, 膨压急剧降低, 细胞溶质体积缩小, 从而引起细胞膜与细胞壁之间的距离加大, Sln1 因为两者之间的距离变化而被激活, 由膜上的均匀分布状态迅速聚集成点状结构, Sln1 的组氨酸激酶活性被抑制, 导致下游 Ypd1 和 Ssk1 不能被磷酸化, 非磷酸化的 Ssk1 能够与 MAPKKK Ssk2 或 Ssk22 相结合, 引起它们的自身磷酸化并被激活, 激活的 Ssk2 或 Ssk22 进而磷酸化并激活下游的 MAPKK Pbs2, 从而引起 Hog1 的磷

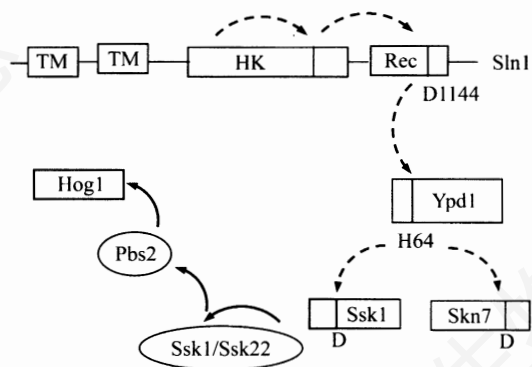


Fig. 2 Diagram showing the program of phosphorylation between components of the HOG pathway in yeast^[7]

TM: transmembrane domain; HK: histidine kinase; Rec: receiver domain; D: aspartate; H: histidine. Solid arrows indicate serine, threonine or tyrosine phosphorylation events during increased osmolarity. Dashed arrows indicate phosphotransfer events in constant osmolarity.

酸化和激活^[10]。最近研究发现, 去磷酸化的 Ssk1 可以被依赖 Ubc7 的泛素蛋白质体系统降解, 这样就降低了其下游 MAPKKK Ssk2 或 Ssk22 的活性, 从而以不同于蛋白磷酸酯酶的方式对渗透压胁迫反应后 Hog1 活性进行负调控, 这对细胞控制 HOG 途径过激活具有重要作用^[11]。

SHO1 途径包括 Sho1、Cdc42、Ste20、Ste11

和 Ste50 等组分。Sho1 的定位和功能均与 Sln1 不同, Sho1 位于细胞膜的极性生长区域, 而在渗透胁迫条件下其在膜上的定位并不发生改变。到目前为止, Sho1 作为渗透感应器的生理功能仍不十分清楚。Sho1 包括 4 个跨膜结构域和一个胞浆 SH3 结构域, 该结构域能够与 Pbs2 N 末端多聚脯氨酸结构域相结合, 构成以 Sho1 为核心的多组分包括 Sho1、Cdc42、Ste20、Ste11、Pbs2 和 Hog1 在内的信号转导复合物, 激活 HOG 途径^[12]。可以肯定的是 MAPKK Pbs2 的激活受 Ste11 的调控, 但是对于渗透胁迫如何激活 Ste11 仍有待于进一步研究。推测可能与 Ste20 和 Ste50 的调节有关。Ste20 催化 Ste11 的磷酸化, 而 Ste11 的磷酸化使其 N 末端结构域的抑制作用被解除, 调控下游信号分子^[13]。Ste50 可能通过 SAM 结构域与 Ste11 形成复合物以协助 Ste11 的功能^[14]。而 p21 激活的蛋白激酶 Ste20 同时也受 Ste50 的激活^[15]。此外, Ste11 也是酿酒酵母其他 MAPK 途径的调控因子, 例如接合信息素反应途径和菌丝形成与侵袭生长途径。因为 Pbs2 与多个蛋白质的功能调节有关, 因此 Pbs2 被认为是一种支架蛋白, 将 Sho1 和 Ste11 在空间上连接在一起被二者激活^[16]。Raitt 等^[12]仔细研究 Sho1 结构域的功能发现, Sho1 的主要功能是将 Pbs2 带到细胞膜的极性生长位点, 而并不专一性地激活 HOG 途径。Mager 等^[17]的研究发现, 即使上述两个分支途径中蛋白因子 Sho1, Ssk2, Ssk22 或 Ste11 缺失, 细胞仍然能够在渗透压胁迫下以依赖 Pbs2 的方式激活 Hog1, 说明 Pbs2 上游第三条途径存在的可能性, 但该途径的组成因子及作用方式仍不清楚。

1.2 Pbs2 和 Hog1 的激活

Ste11, Ssk2 或 Ssk22 均可激活 Pbs2。将 Pbs2 磷酸化位点(丝氨酸 514 和苏氨酸 518)突变为丙氨酸, 可以引起酵母菌对渗透压胁迫的敏感性。而将其突变为天冬氨酸则可组成型地激活 HOG 途径^[18]。Pbs2 一旦被激活, 它就磷酸化 Hog1 Thr174 和 Tyr176 残基, 并导致 Hog1 向细胞核转移。利用 DNA 微阵列分析技术研究表明, 在高渗胁迫下 Hog1 进入细胞核内后可以调控 600 多个基因的表达^[19]。

1.3 Hog1 的负调控: 蛋白磷酸酯酶

在高渗透压环境胁迫条件下, Hog1 的 Thr174 和 Tyr176 被磷酸化, HOG 途径被激活, 从而诱导胁迫响应基因的表达。而当响应反应发生后, 细胞必须下调 HOG 途径, 因为 HOG 途径的持续激活会

引起细胞损伤甚至死亡。在酿酒酵母中, HOG 途径受蛋白磷酸酯酶的负调控。酿酒酵母中存在 3 种酪氨酸蛋白磷酸酯酶(protein tyrosine phosphatase, PTP): Ptp1, Ptp2 和 Ptp3。Ptp1 对 MAPK 信号转导途径没有调控作用, Ptp2 和 Ptp3 则分别参与了不同 MAPK 信号转导途径的调控^[17]。组成型的 Hog1 激活, 例如, *sln1Δ* 缺失或者高活性 Ssk2ΔN 的表达, 均可引起细胞的生长抑制甚至死亡。这种致死性能够被 Ptp2 和 Ptp3 的过量表达所抑制, 表明 Ptp2 和 Ptp3 对 HOG 途径具有负调控作用, 这是由于这两种 PTP 能够使 Hog1 去磷酸化^[20]。

除了酪氨酸磷酸酯酶以外, 2C 类蛋白磷酸酯酶(PP2C)Ptc1 和 Ptc3 也能负调控 HOG 途径。Ptc1 和 Ptc3 的过量表达均抑制了由于 Hog1 过度激活引起的细胞死亡^[21,22]。通过检测 Hog1 的磷酸化水平发现, *ptc1Δptc2Δ* 双缺失突变体会引起 Hog1 的过度磷酸化。进一步通过体外实验表明 Ptc1 仅对 Hog1 的苏氨酸残基去磷酸化, 而对 Hog1 上游激酶没有作用。Ptc2 和 Ptc3 可能以相似的机制负调控 HOG 途径^[23]。在裂殖酵母中也存在与此类似的机制, PP2C 抑制 MAPK Spc1/Sty1 活性, 对其上游 MEK 没有抑制作用^[24]。Ptc1 催化的 Hog1 的去磷酸化需要 Nbp2 的参与, Nbp2 SH3 结构域与 Pbs2 相结合, 其 N 末端可能直接或通过其他未知的蛋白质因子与 Ptc1 相结合, 因为 Pbs2 能够与 Hog1 结合, 从而形成一个包含 Ptc1、Nbp2、Pbs2 和 Hog1 的复合物, 协同作用调控 Hog1 MAPK^[25]。

2 HOG 途径组分的亚细胞定位

2.1 Hog1 蛋白的跨膜转运

在非胁迫条件下, Hog1 存在于酵母细胞胞浆内。而在渗透压胁迫下, Hog1 迅速向细胞核转移。向细胞核内转移的 Hog1 处于磷酸化状态, 而 Hog1 是否具有激酶活性并不影响其跨膜转运。通过构建激酶活性缺失突变体(K52M)的研究表明: 该突变体能够与野生型一样有效的向细胞核转运, 而其磷酸化位点缺陷型突变体(T174A, T176A)则不能有效地向细胞核转运^[7]。此外, Hog1 的核转运还依赖于 Gsp1(Ran 同源物)和 Nmd5(内转运蛋白)的协同作用。然而 Hog1 的核定位信号(nuclear localization signal, NLS)是否与内转运蛋白 Nmd5 直接互作, 或者 Hog1 是否被动地被其他的核蛋白转运目前仍不清楚^[7]。而在细胞核内, Hog1 能被核蛋白锚定。

胁迫专一性转录因子 Msn2 和 Msn4 可能作为细胞核内 Hog1 的锚定蛋白,因为在 *msn2Δmsn4Δ* 双缺失株中, Hog1 从核内运出的速度较野生型迅速。此外,酪氨酸蛋白磷酸酯酶也参与 Hog1 的定位, Ptp2 的过量表达使 Hog1 大部分存在于核内,而 Ptp3 过量表达主要则将 Hog1 定位于胞浆内^[7]。

2.2 Pbs2 的亚细胞定位

在野生型酵母细胞内, Pbs2 无论在正常或者渗透压胁迫条件下,均存在于胞浆中。而在 *ssk1*、*stel1* 双缺失突变体或者 *pbs2* 激酶活性缺失突变体内,渗透压胁迫促使 Pbs2 集中到酵母细胞极性生长区域。此过程需要 Sln1 和 Cdc42 的共同参与^[5]。序列分析表明: Pbs2 N 末端具有核运出信号(nuclear export signal, NES)序列,当 NES 缺失后, Pbs2 主要位于核内,对裂殖酵母 Pbs2 同源物 MAPKK Wis1 进行研究,发现了与之相似的 NES。而 Pbs2 NES 缺失体的核定位又依赖于 Pbs2 C 末端附近的 NLS^[26]。这些研究表明 Pbs2 和 Wis1 在胞浆和细胞核内穿梭,然而到目前为止, NES 和 NLS 的功能仍不清楚,因为缺失一个或者同时缺失均对 Hog1 的激活没有明显影响。

哺乳动物细胞中存在与酵母 Hog1 MAPK 途径类似的受胁迫诱导的 p38 MAPK 信号途径,其 MAPKK Mkk3/Mkk6 与酵母 MAPKK Pbs2, MAPK p38 与酵母 MAPK Hog1 均具有极高的同源性。哺乳动物 p38 可以完全互补酵母 *hog1Δ* 缺失突变株对渗透压胁迫的敏感性^[27],表明 Hog1 途径在真核细胞中是保守的。除 p38 MAPK 途径外,哺乳动物 JNK (c-Jun kinase) MAPK 途径同样受包括渗透胁迫,紫外线照射,炎症反应等胁迫条件的诱导。p38 和 JNK 在细胞中均以多种形式存在,这主要是由于在基因转录过程中 mRNA 的选择性剪接造成的。不同的是, JNK 受 MAPKK Mkk4 的激活,而 p38 受 MAPKK Mkk3 或 Mkk6 的激活^[28]。

近年来,酿酒酵母 HOG 信号转导途径研究已经取得很大的进展,尤其对该途径核心分子 Hog1 的功能及其调控机制已经研究得比较清楚,但是对其亚细胞定位的研究仍有待于进一步深入,尤其是

Hog1 从胞浆向核内运输的调控机制以及必需的辅助因子仍不十分清楚。而渗透压适应反应后 Hog1 如何从细胞核重新转移到胞浆也需要进一步确定。激活的 Hog1 除了转移到细胞核中去激活转录因子外,还可以磷酸化和激活另外一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Rck2^[29,30]。Rck2 的底物目前还未知,然而它通过控制细胞的转译过程来影响整个细胞的蛋白质合成^[31,32]。此外, Rck2 和 HOG 途径还与酵母细胞抗氧化、抗重金属胁迫相关^[33,34]。HOG 途径和 Rck2 如何与抗氧化相关蛋白质之间的互作也将是今后研究的热点之一。

参考文献(References)

- [1] Posas F *et al.* *Curr Opin Microbiol*, 1998, **1**: 175
- [2] Gustin MC *et al.* *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**: 1264
- [3] Huang LS *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005 **102**: 12431
- [4] Welsh DT. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, **24**: 263
- [5] O'Rourke SM *et al.* *Trends Genet*, 2002, **18**: 405
- [6] Porter SW *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1748**: 138
- [7] Saito H *et al.* *J Biochem (Tokyo)*, 2004, **136**: 267
- [8] Xu Q *et al.* *Structure*, 2003, **11**: 1569
- [9] Saito H. *Chem Rev*, 2001, **101**: 2497
- [10] Reiser V *et al.* *J Cell Biol*, 2003, **161**: 1035
- [11] Sato N *et al.* *Mol Cell Biol*, 2003, **23**: 6662
- [12] Raitt DC *et al.* *EMBO J*, 2000, **19**: 4623
- [13] Drogen F *et al.* *Curr Biol*, 2000, **10**: 630
- [14] Posas F *et al.* *Mol Cell Biol*, 1998, **18**: 5788
- [15] Jansen G *et al.* *Mol Genet Genomics*, 2001, **265**: 102
- [16] Kolch W. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, **6**: 827
- [17] Mager WH *et al.* *FEMS Yeast Res*, 2002, **2**: 251
- [18] Wurgler-Murphy SM *et al.* *Mol Cell Biol*, 1997, **17**: 1289
- [19] Posas F *et al.* *J Biol Chem*, 2000, **275**: 17249
- [20] Alexander MR *et al.* *Mol Biol Cell*, 2001, **12**: 53
- [21] Maeda T *et al.* *Nature*, 1994, **369**: 242
- [22] Young C *et al.* *Eukaryot Cell*, 2002, **1**: 1032
- [23] Warmka J *et al.* *Mol Cell Biol*, 2001, **21**: 51
- [24] Nguyen A N *et al.* *Genes Dev*, 1999, **13**: 1653
- [25] Mapes J *et al.* *EMBO J*, 2004, **23**: 302
- [26] Tatebayashi K *et al.* *EMBO J*, 2003, **22**: 3624
- [27] Posas F *et al.* *EMBO J*, 1998, **17**: 1385
- [28] Takekawa M *et al.* *EMBO J*, 1997, **16**: 4973
- [29] Jiang L *et al.* *Mol Genet Genomics*, 2004, **271**: 208
- [30] Bilsland-Marchesan E *et al.* *Mol Cell Biol*, 2000, **20**: 3887
- [31] Teige M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 5625
- [32] Swaminathan S *et al.* *Mol Biol Cell*, 2006, **17**: 1472
- [33] Swaminathan S *et al.* *Mol Genet Genomics*, 2005, **273**: 433
- [34] Bilsland E *et al.* *Mol Microbiol*, 2004, **53**: 1743

High Osmolarity Glycerol MAP Kinase Signal Transduction Pathway

Hai-Hua Ruan, Xi-Chuan Li, Pei Lan, Ling-Huo Jiang*

(College of Pharmaceuticals and Biotechnology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract High osmolarity glycerol (HOG), one of the classical MAP kinase cascades, is essential for cell survival under high osmolar conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. Here, we reviewed the recent progress on the study of the whole HOG pathway as well as the regulation and functions of the components in the HOG pathway. The study on how yeast cells respond to high osmolarity has provided the basis for our understanding of mammalian and plant cells in response to environmental stresses.

Key words *Saccharomyces cerevisiae*; signal transduction; MAP kinase cascade; HOG pathway

Received: January 11, 2006 Accepted: June 9, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30571047) and Postdoctoral Fellowship of Minister of Education (No.2005037520)

*Corresponding author. Tel: 86-22-27402527, E-mail: linghuojiang@yahoo.com.cn