

*Liz1*基因缺失对粟酒裂殖酵母有丝分裂动力学的影响

阮渝涵¹ 潘凤² 林音镗² 任兴蕊² 侯怡铃² 丁祥^{1*}⁽¹⁾西华师范大学环境科学与工程学院, 南充 637009;⁽²⁾西华师范大学生命科学学院, 西南野生动植物资源保护教育部重点实验室, 南充 637009)

摘要 *Liz1*基因编码质膜泛酸盐跨膜转运蛋白Liz1, 其定位于高尔基体和质膜。*Liz1*基因缺失会导致粟酒裂殖酵母有丝分裂间期微管细胞骨架异常、胞质分裂异常和细胞周期异常的现象, 但*Liz1*基因缺失对细胞有丝分裂的作用机制尚未被完全揭示。该研究利用活细胞成像技术观察带有荧光标记的*Liz1Δ*菌株, 探究其标准温度和高温胁迫下*Liz1*基因缺失对菌株的生长速率、产孢数量及有丝分裂期微管蛋白、肌动蛋白、组蛋白动力学的影响。结果表明, 在标准温度下, *Liz1*基因缺失导致细胞生长缓慢, 纺锤体伸长时间延缓15%($P<0.01$), 染色体分离到胞质分裂时间延缓22%($P<0.01$), 肌动蛋白环形成时间延缓12%($P<0.05$); 在高温胁迫下, *Liz1Δ*细胞生长更缓慢, 肌动蛋白环形成到收缩的总时间延缓14%($P<0.05$)。该研究揭示了*Liz1*基因缺失导致细胞生长延缓, 其关键作用机制是延缓了细胞在有丝分裂后期纺锤体的伸长及肌动蛋白环的形成, 为进一步明确Liz1蛋白在细胞有丝分裂中的功能提供了一定的科学依据。

关键词 粟酒裂殖酵母; *Liz1*基因; 有丝分裂; 微管蛋白; 肌动蛋白

Effect of *Liz1* Gene Deletion on Mitotic Kinetics in Fission Yeast

RUAN Yuhan¹, PAN Feng², LIN Yintang², REN Xingrui², HOU Yiling², DING Xiang^{1*}⁽¹⁾College of Environmental Science and Engineering, China West Normal University, Nanchong 637009, China;⁽²⁾Key Laboratory of Southwest Wildlife Resource Conservation, Ministry of Education, College of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong 637009, China)

Abstract The *Liz1* gene encodes the plasma membrane pantothenate transmembrane transporter protein Liz1, which is localized to the Golgi apparatus and plasma membrane. *Liz1* gene deletion led to abnormalities of microtubule cytoskeleton, cytoplasmic division, and cell cycle during the mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. However, the underlying mechanism of the impact of *Liz1* gene deletion on cell mitosis has not been fully revealed. This study used live cell imaging technology to observe the fluorescence labeled *Liz1Δ* strain to explore the effects of *Liz1* gene deletion on the growth rate, sporulation quantity, and dynamics of microtubules, actin, and histones during mitosis of the *Liz1Δ* strain under standard temperature and high temperature stress. The results showed that at standard temperatures, *Liz1* gene deletion resulted in slow cell growth with a 15% delay in spindle elongation time ($P<0.01$), a 22% delay in chromosome segregation to cell separation time ($P<0.01$) and a 12% delay in actin

收稿日期: 2025-05-15

接受日期: 2025-08-04

四川省科技厅应用基础面上项目(批准号: 2022NSFSC0107)、四川省科技厅农业科技成果转化资金项目(批准号: 2022NZJJ0003)和四川省转移支付科技成果转化转移转化示范项目(批准号: 22ZYZFSF0009、23ZHSF0082)资助的课题

*通信作者。Tel: 18780759981, E-mail: biostart8083@126.com

Received: May 15, 2025

Accepted: August 4, 2025

This work was supported by the Project of Sichuan Provincial Department of Science and Technology (Grant No.2022NSFSC0107), the Agricultural Scientific and Technological Achievement Transformation Funding Project of Sichuan Provincial Department of Science and Technology (Grant No.2022NZJJ0003), and the Sichuan Provincial Transfer Payment for Scientific and Technological Achievement Transfer and Transformation Demonstration Project (Grant No. 22ZYZFSF0009, 23ZHSF0082)

*Corresponding author. Tel: +86-18780759981, E-mail: biostart8083@126.com

ring formation time ($P < 0.05$). Under high-temperature stress, the slow growth of *Liz1Δ* strains was exacerbated, and the total time for actin ring formation to contraction was delayed by 14% ($P < 0.05$). The data indicate that the deletion of the *Liz1* gene leads to delayed cell growth, and its key mechanism is to delay the elongation of the spindle in the anaphase of mitosis and the formation of actin ring, which provides a scientific basis for further clarifying the function of Liz1 protein in cell mitosis.

Keywords *Schizosaccharomyces pombe*; *Liz1* gene; mitosis; microtubules; actin

纺锤体是由 α 和 β 微管蛋白组装而成的细胞结构。在有丝分裂中,纺锤体精准调控染色体的聚集和分离,确保成套的遗传物质准确的传递到子细胞,保证细胞正常生命活动,这一过程受多种蛋白共同调控^[1-2]。在粟酒裂殖酵母中,微管蛋白和微管相关蛋白(microtubule-associated proteins, MAPs)共同参与调控纺锤体的动力学。例如,*Atb2*基因编码的 α -微管蛋白通过在有丝分裂后期通过调控纺锤体的伸长来调控染色体的分离^[3-4]; *Clp1*基因编码裂解因子多核糖核苷酸激酶亚单位CLP1蛋白,其参与调控驱动蛋白6家族Klp9(kinesin-6 family microtubule motor protein),使Klp9和Aurora-B激酶Ark1(Aurora-B kinase)共同定位于纺锤体中间区,影响有丝分裂后期纺锤体伸长^[5]。

*Liz1*基因编码的粟酒裂殖酵母质膜泛酸盐跨膜转运蛋白Liz1(plasma membrane pantothenate transmembrane transporter Liz1)(图1A和图1B),定位于高尔基体和质膜^[6],是粟酒裂殖酵母中泛酸摄取所必需的蛋白^[7]。在葡萄糖缺失培养基或以乙醇为碳源的培养基上,*Liz1Δ*菌株生长缓慢。在加入甲酰胺的葡萄糖完全培养基中,*Liz1Δ*菌株则出现细胞周期停滞的现象^[8]。*Liz1*基因缺失导致细胞内泛酸合成受阻,影响脂肪酸的合成,在低浓度泛酸条件下,导致细胞生长缓慢,并在羟基脲作用下使有丝分裂过程中DNA复制停滞在S期^[8],部分细胞出现染色体未分离和胞质分裂延缓的异常现象^[7],加入高浓度泛酸盐,会使细胞生长缓慢和异常有丝分裂恢复正常,但研究表明*Liz1*基因还与调控有丝分裂后期纺锤体伸长的*Atb2*基因和核糖核苷还原酶大亚基*Cdc22*基因表现出正向遗传相互作用。*Atb2*基因的突变体*atb2-983*会导致有丝分裂后期纺锤体伸长延缓,而*Liz1*基因缺失会导致有丝分裂微管束减少^[9],二者共同影响有丝分裂纺锤体的形成和伸长;*cdc22-M45*突变株中DNA复制在S期停留,并出现部分细胞生长停滞的现象;在*cdc22-M45*突变株中,同时缺失*Liz1*基因会导致胞质分裂

延缓,加剧细胞生长停滞^[10]。*Liz1*基因分别与*Atb2*基因和*Cdc22*基因相互作用,共同影响粟酒裂殖酵母有丝分裂过程,但*Liz1*基因缺失对细胞有丝分裂影响的作用机制尚未完全揭示。

粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)是一种单细胞真核生物,基因组有大约4 900个基因,其中26.1%为必需基因。粟酒裂殖酵母因具有明确的细胞形状和高度活跃的同源重组机制,是生物学中优质的模式生物^[11-12]。本研究以粟酒裂殖酵母为模型,利用活细胞成像技术观察带有荧光标记的*Liz1Δ*菌株,探究其标准温度和高温胁迫下*Liz1*基因缺失对菌株的生长速率、产孢数量及有丝分裂期微管蛋白、肌动蛋白、组蛋白动力学的影响,为进一步揭示Liz1蛋白在细胞周期的调控作用提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

本研究所用的实验菌株均保存在西华师范大学生命科学院西南野生动植物资源保护教育部重点实验室(表1)。

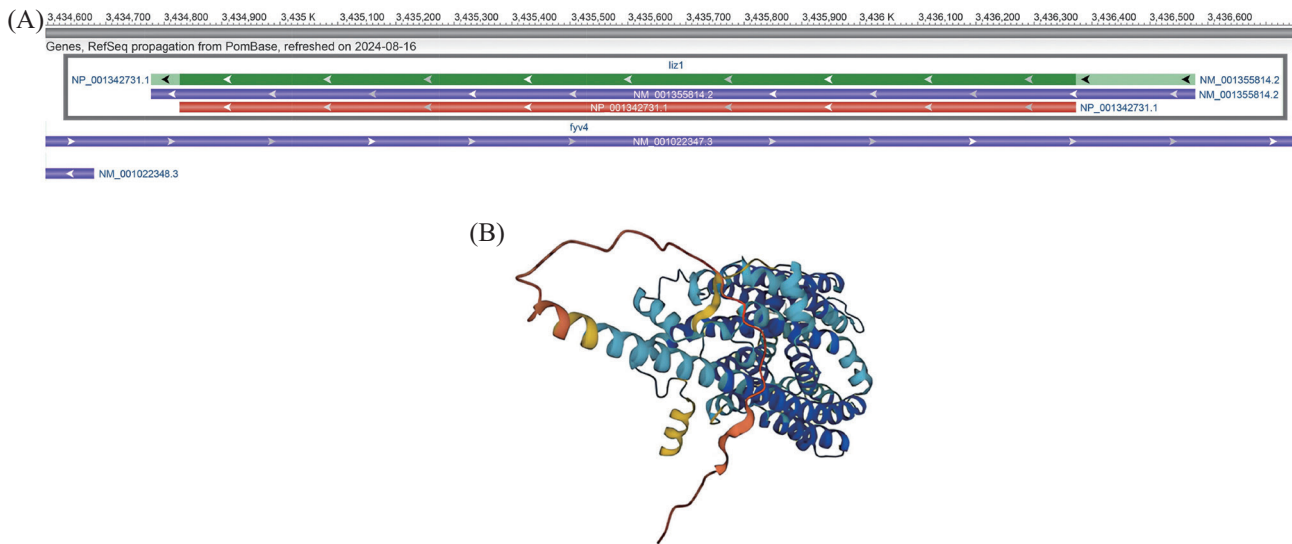
1.2 培养基

YE5S液体培养基(500 mL): 15 g葡萄糖、2.5 g酵母提取物、0.112 5 g腺嘌呤、0.112 5 g亮氨酸、0.112 5 g尿嘧啶、0.112 5 g赖氨酸、0.112 5 g组氨酸、500 mL超纯水。

YE5S固体培养基(500 mL): 15 g葡萄糖、2.5 g酵母提取物、0.112 5 g腺嘌呤、0.112 5 g亮氨酸、0.112 5 g尿嘧啶、0.112 5 g赖氨酸、0.112 5 g组氨酸、8.5 g琼脂粉、500 mL超纯水。

YE5S-G418(HygR)固体培养基(500 mL): 500 mL YE5S固体培养基、5 mL无菌且浓度为 3×10^{-4} mg/ μ L的遗传霉素(或潮霉素)。

EMM-N培养基(500 mL): 10 g葡萄糖、3.66 g EMM-N粉末、0.112 5 g腺嘌呤、0.112 5 g尿嘧啶、



A: *Liz1*基因位置; B: *Liz1*蛋白结构。
A: the location of *Liz1*; B: the structure of the *Liz1* protein.

图1 *Liz1*基因位置和*Liz1*蛋白结构
Fig.1 The *Liz1* gene location and *Liz1* protein structure

表1 实验所用粟酒裂殖酵母菌株和基因型

Table 1 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> strains and genotypes in the experiment		
菌株编号 Strain number	基因型 Genotype	来源 Source
PT. 286	wt: <i>ade6-210 leul-32 ura4-D18 h⁻</i>	TRAN P T ^[13]
PT. 287	wt: <i>ade6-210 leul-32 ura4-D18 h⁺</i>	TRAN P T ^[13]
YL15	wt: <i>Atb2-GFP:HygR/Pact1-LifeAct-mC:LEU1 h⁺</i>	ZHANG D ^[14]
YL26	wt: <i>Atb2-GFP:HygR/Hht1-RFP:HygR h⁻</i>	ZHANG D ^[14]
HY 824	<i>Liz1Δ: KanR/ade6-210 leul-32 ura4-D18 h⁺</i>	TRAN P T ^[13]
HY 824-1	<i>Liz1Δ: KanR/ade6-210 leul-32 ura4-D18 h⁻</i>	This study
HY 824-2	<i>Liz1Δ: KanR/Atb2-GFP:HygR/Pact1-LifeAct-mC:LEU1 h⁺</i>	This study
HY 824-3	<i>Liz1Δ: KanR/Atb2-GFP:HygR/ Hht1-RFP:HygR h⁻</i>	This study

0.112 5 g组氨酸、0.112 5 g赖氨酸、0.112 5 g亮氨酸、30 g琼脂粉、500 mL超纯水。

EMM2-Leu培养基(500 mL): 10 g葡萄糖、16.165 0 g EMM-N2粉末、0.112 5 g腺嘌呤、0.112 5 g尿嘧啶、0.112 5 g组氨酸、0.112 5 g赖氨酸、30 g琼脂粉、500 mL超纯水。

1.3 生长曲线

25℃及37℃下的生长曲线: 从-80℃的超低温冰箱中, 吸取少量甘油保存的PT287菌株和HY824菌株, 接种至YE5S固体培养基中复苏48 h。将复苏完成的菌株接种至液体培养基于25℃摇床(200 r/min)中培养10~12 h后, 将菌液 D_{595} 稀释至0.1, 转入25℃或37℃摇床(200 r/min)中培养, 每隔2 h测量一次25℃或37℃下的 D_{595} 值, 共测6次(12 h), 并用GraphPad

Prism 8绘制生长曲线。

1.4 菌株构建

1.4.1 产孢 刮取适量复苏的PT287野生型菌株和HY824菌株分别接种在EMM-N板上, 挑取与其性别相反的菌株混合均匀, 放置在25℃恒温培养箱培养48 h, 刮取少量菌株制片, 利用正置显微镜镜检产孢情况, 统计孢子数量。用GraphPad Prism 8软件绘图进行分析。

1.4.2 荧光蛋白标记构建 将HY824菌株分别与YL15菌株和YL26菌株交配产孢, 加入1%浓度的蜗牛酶溶液, 室温裂解细胞24 h后得到孢子, 无菌水清洗3次, 依次用YE5S-G418抗性培养基、EMM2-Leu营养缺陷培养基、YE5S-HygR抗性培养基分别筛选出HY 824-2和HY 824-3菌株, 镜检验证带目标标记的敲除

菌株,将目标菌株用30%甘油保存到-80℃冰箱。

1.5 活细胞成像

将复苏48 h的HY824-2、HY824-3,接种至YE5S液体培养基,在25℃/37℃摇床培养12 h。在25℃/37℃条件下,用LeicaTCS-SP8激光共聚焦显微镜进行活细胞成像。激光共聚焦显微镜参数设置如下,曝光时间400 ms,像素512 μm×512 μm,1.5倍视野,每帧7层,间隔6.02 μm,每隔120 s拍摄一帧,一共拍摄60帧。

1.6 数据统计与分析

用ImageJ测量细胞有丝分裂纺锤体伸长长度变化量(ΔL_1)和时间变化量(Δt_1)、肌动蛋白环变化长度变化量(ΔL_2)和时间(Δt_2),并计算纺锤体伸长速率(V_1)(纺锤体伸长长度/纺锤体伸长时间)和肌动蛋白环各时期速率(V_2)(肌动蛋白环变化长度/相应时期时间),再用IBM SPSS 23.0进行统计学分析。统计学差异显示*和**分别表示*Liz1Δ*菌株对比野生型菌株差异显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)。 ΔL : 纺锤体伸长(或肌动蛋白环收缩)的运动轨迹(μm); Δt : 纺锤体伸长(或肌动蛋白环收缩)的运动时间(min); V : 纺锤体伸长(或肌动蛋白环收缩)的速率(μm/min)。

$$V = \frac{\Delta L}{\Delta t}$$

1.7 Western blot检测蛋白质表达量

将复苏好的YL26菌株和HY 824-3菌株,加入裂解液(SDS裂解液:1%蜗牛酶溶液:PMSF=100:100:1),超声破碎10 min,取上清蛋白质溶液,BCA法测定蛋白质总浓度。制备12% PAGE胶和5%浓缩胶进行SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白,20 μg蛋白质样品上样,转膜。再使用5%浓度的BSA室温封闭4 h,转入一抗(1:6 000)低温(4℃)孵育过夜。洗膜三次后转入二抗(1:8 000)室温孵育1 h。洗膜五次后加入ECL检测试剂并使用凝胶成像仪显影成像,以β-Actin为内参蛋白质,比较野生型菌株和*Liz1Δ*菌株中微管蛋白表达水平的差异^[15]。

$$\text{归一化结果} = \frac{\text{样品值}}{\text{内参值}}$$

2 结果与分析

2.1 *Liz1*基因缺失对裂殖酵母生长量和产孢数量的影响

生长曲线结果显示野生型菌株中的PT287菌

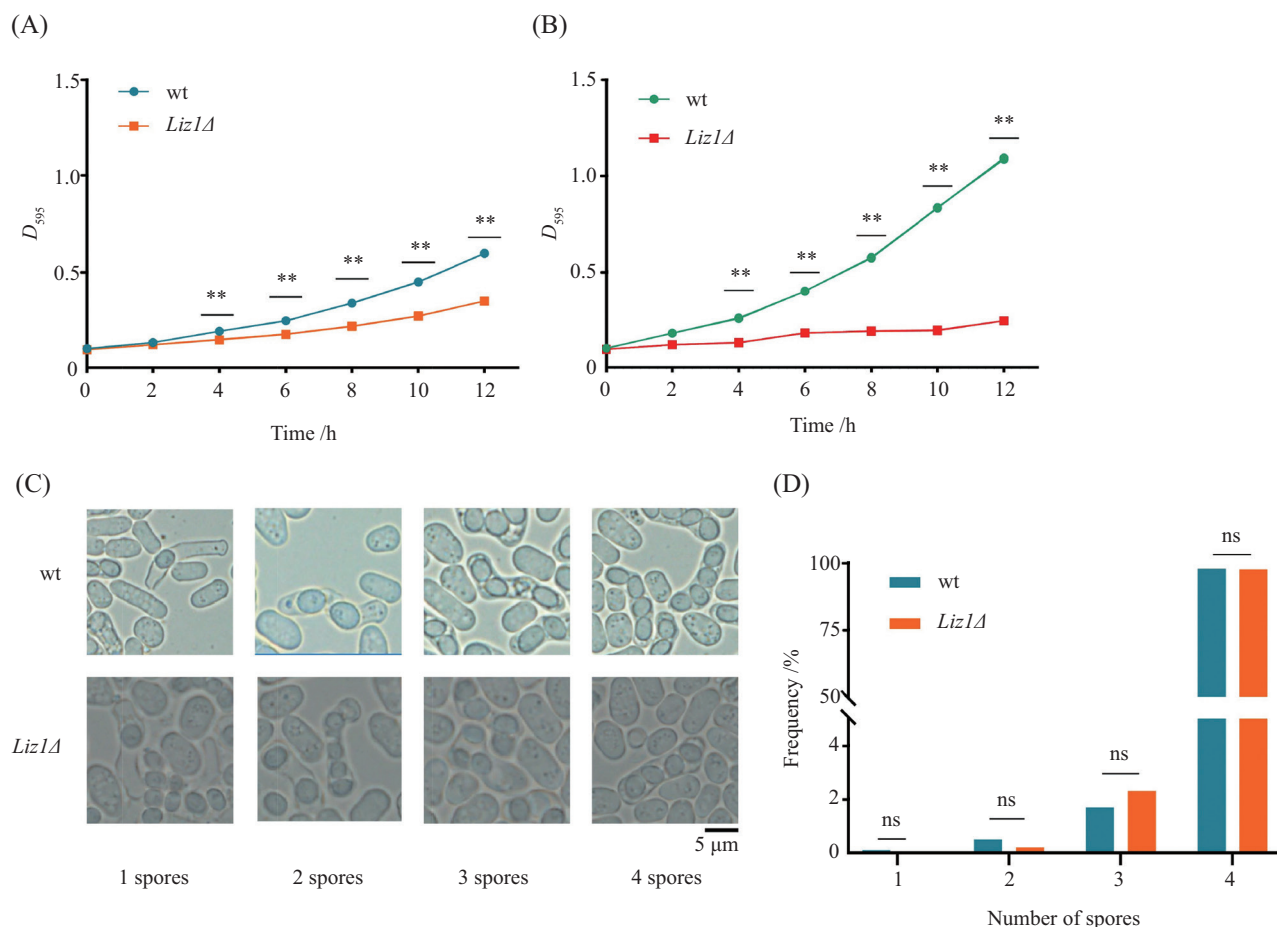
株和*Liz1Δ*菌株中的HY824菌株在25℃和37℃下,都从4 h开始出现极显著差异。4 h时, HY824菌株*D*₅₉₅在25℃和37℃下,分别较PT287菌株减少(0.043±0.001)($P<0.01$)(图2A)和(0.128±0.001)($P<0.01$)(图2B)。则*Liz1*基因缺失在标准温度下和高温胁迫下均会导致细胞生长减缓。产孢结果显示,PT287菌株和HY824菌株产4个子囊孢子数比例分别为97.61%和98.54%(图2C和图2D),两者无显著差异。

2.2 *Liz1*基因缺失对裂殖酵母间期微管的影响

用Atb2-GFP标记野生型菌株中的YL 26菌株和*Liz1Δ*菌株中的HY 824-3菌株的微管(tubulin alpha 2, Atb2)(图3A和图3D),探究*Liz1*基因缺失对裂殖酵母的微管束数量、长度及微管蛋白含量的影响(图3B、图3C、图3E和图3F)。统计微管束发现(图3B和图3E),标准温度下野生型和*Liz1Δ*菌株均具有2、3和4束微管束,比例分别为(27.50±10.60)%、(65.00±7.07)%、(7.50±3.54)%和(40.00±21.21)%、(52.52±24.74)%、(7.50±3.54)%,微管蛋白量和荧光强度无显著差异。高温胁迫下野生型和*Liz1Δ*菌株的2、3和4束微管束的比例分别为(21.67±2.89)%、(56.67±2.87)%、(21.67±2.87)%和(16.00±11.53)%、(51.67±7.63)%、(31.67±5.77)%,但*Liz1Δ*菌株在标准温度和高温胁迫下的3束微管束比例极显著减少(12.48±3.32)%和(5.00±1.05)% ($P<0.01$)。统计微管束长度显示(图3C和图3F),标准温度下野生型和*Liz1Δ*菌株微管束的平均长度分别为(6.61±0.50) μm和(7.54±0.89) μm, *Liz1Δ*菌株微管束的平均长度显著增长(0.87±0.36) μm($P<0.05$)。高温胁迫下野生型和*Liz1Δ*菌株微管束的平均长度分别为(6.71±1.83) μm和(7.25±1.69) μm,并无显著差异。结果表明, *Liz1*基因缺失导致裂殖酵母出现微管束数量减少现象,且微管束长度增加,这与前人研究中*Liz1*基因缺失导致微管束减少的研究一致^[9]。另外,发现总微管蛋白量并未随着微管束的变化而减少。

2.3 *Liz1*基因缺失延缓裂殖酵母有丝分裂纺锤体伸长

将野生型菌株中的YL 26菌株和*Liz1Δ*菌株中的HY 824-3菌株的微管蛋白用Atb2-GFP标记(图4A和图4B)后进行活细胞成像,并绘制细胞纺锤体长度随时间变化图像(图4C和图4D)。25℃下, *Liz1Δ*菌株较野生型菌株纺锤体总伸长时间延缓(4.95±0.95)



A: 25 °C下野生型菌株和*Liz1Δ*菌株的生长曲线($n=3$); B: 37 °C下野生型菌株和*Liz1Δ*菌株的生长曲线($n=3$); C: 野生型菌株和*Liz1Δ*菌株的孢子形态; D: *Liz1Δ*菌株和野生型菌株不同孢子数($n=1\ 500$)。ns $P>0.05$, ** $P<0.01$, 与野生型菌株相比。

A: growth curves of wild-type and *Liz1Δ* strains at 25 °C ($n=3$); B: growth curves of wild-type and *Liz1Δ* strain at 37 °C ($n=3$); C: morphology of spore in wild-type and *Liz1Δ* strains; D: spores number in wild-type and *Liz1Δ* strains. ($n=1\ 500$). ns $P>0.05$, ** $P<0.01$ compared with wt group.

图2 *Liz1*基因缺失对细胞生长和孢子数量的影响

Fig.2 Effects of *Liz1* gene deletion on the growth and the spore number of cells

min($P<0.01$)(图4E), 纺锤体总伸长长度无显著差异(图4F), 纺锤体总伸长速率减缓(0.13 ± 0.03) $\mu\text{m}/\text{min}$ (图4G)。进一步分时期分析发现, *Liz1Δ*菌株有丝分裂后期纺锤体伸长时间延缓(2.70 ± 0.60) min($P<0.01$)(图4E), 有丝分裂后期伸长速率减缓(0.22 ± 0.05) $\mu\text{m}/\text{min}$ ($P<0.01$)(图4G)。37 °C下, *Liz1Δ*菌株与野生型菌株的总伸长时间、总伸长速率以及总伸长长度无显著差异(图4H~图4J)。结果表明, 在标准温度下*Liz1*基因缺失将导致纺锤体后期伸长延缓。

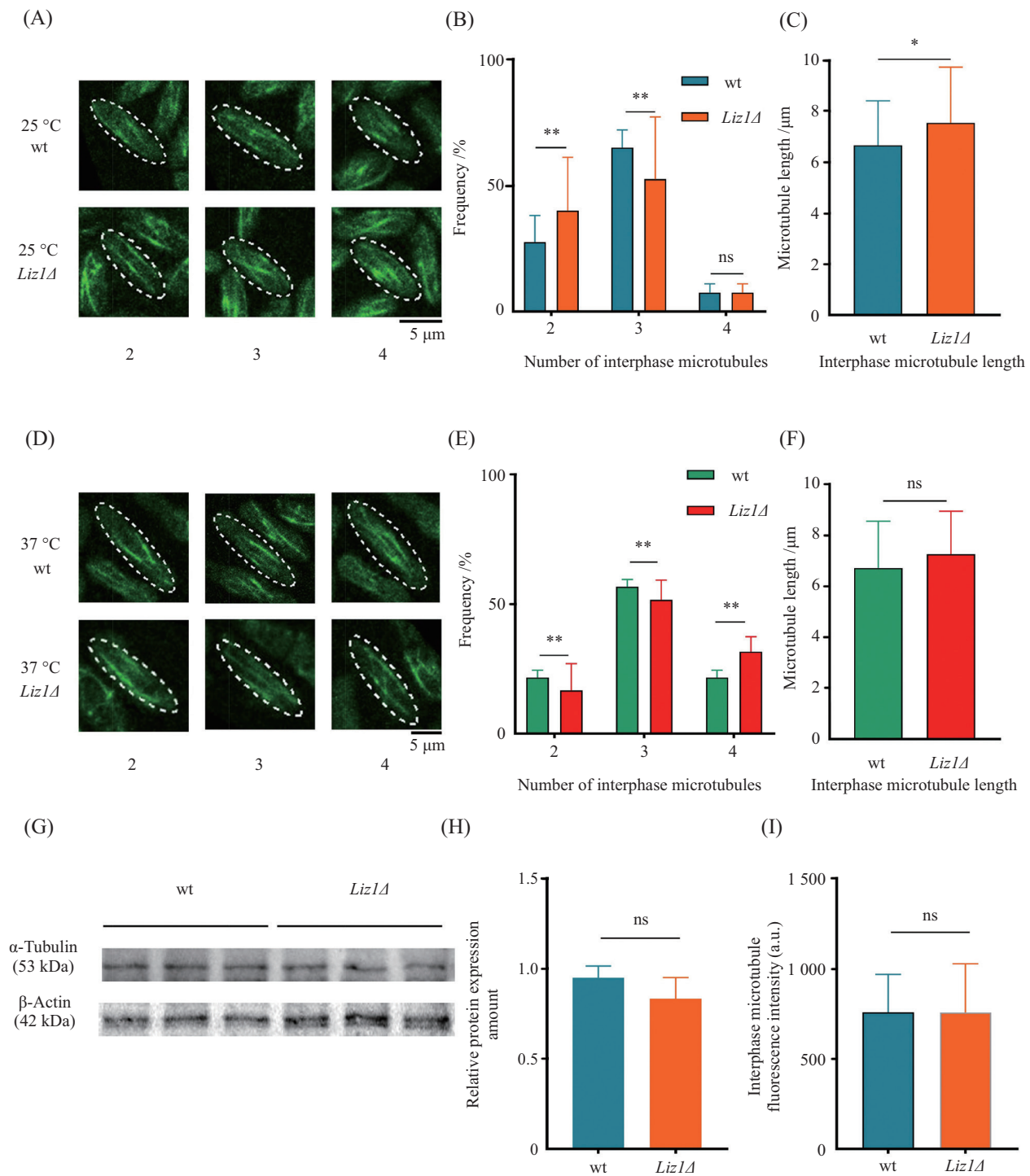
2.4 *Liz1*基因缺失对裂殖酵母有丝分裂染色体的影响

用Hht1-RFP标记野生型菌株中的YL 26菌株和*Liz1Δ*菌株中的HY 824-3菌株的组蛋白(histone H3, Hht1), 并进行活细胞成像(图5A和图5B)。25 °C下, *Liz1Δ*菌株从染色体分离(chromosome segregation,

CS)到细胞隔膜形成(cell septa formation, CSF), 最后再到细胞分离(cell septa separation, CSS)的总时间较野生型延缓(9.00 ± 3.37) min($P<0.01$)(图5C)。37 °C下, *Liz1Δ*菌株从染色体分离到细胞分离的时间较野生型无显著变化(图5D)。结果表明, *Liz1*基因缺失会延缓染色体分离到细胞分开的时间。

2.5 *Liz1*基因缺失对裂殖酵母有丝分裂肌动蛋白环动力学影响

有丝分裂中期, 细胞内散状分布的肌动蛋白丝会聚集在细胞赤道板周围, 形成肌动蛋白环, 并完成肌动蛋白环的收缩。在高温胁迫下, 肌动蛋白环形成和收缩总时间显著减少^[16]。用Pact-LifeAct-mCherry标记野生型菌株中的YL 15菌株和*Liz1Δ*菌株中HY 824-2菌株的肌动蛋白(F-actin)进行活细胞成像(图6A和图6B), 分析25 °C下的*Liz1Δ*菌株与野

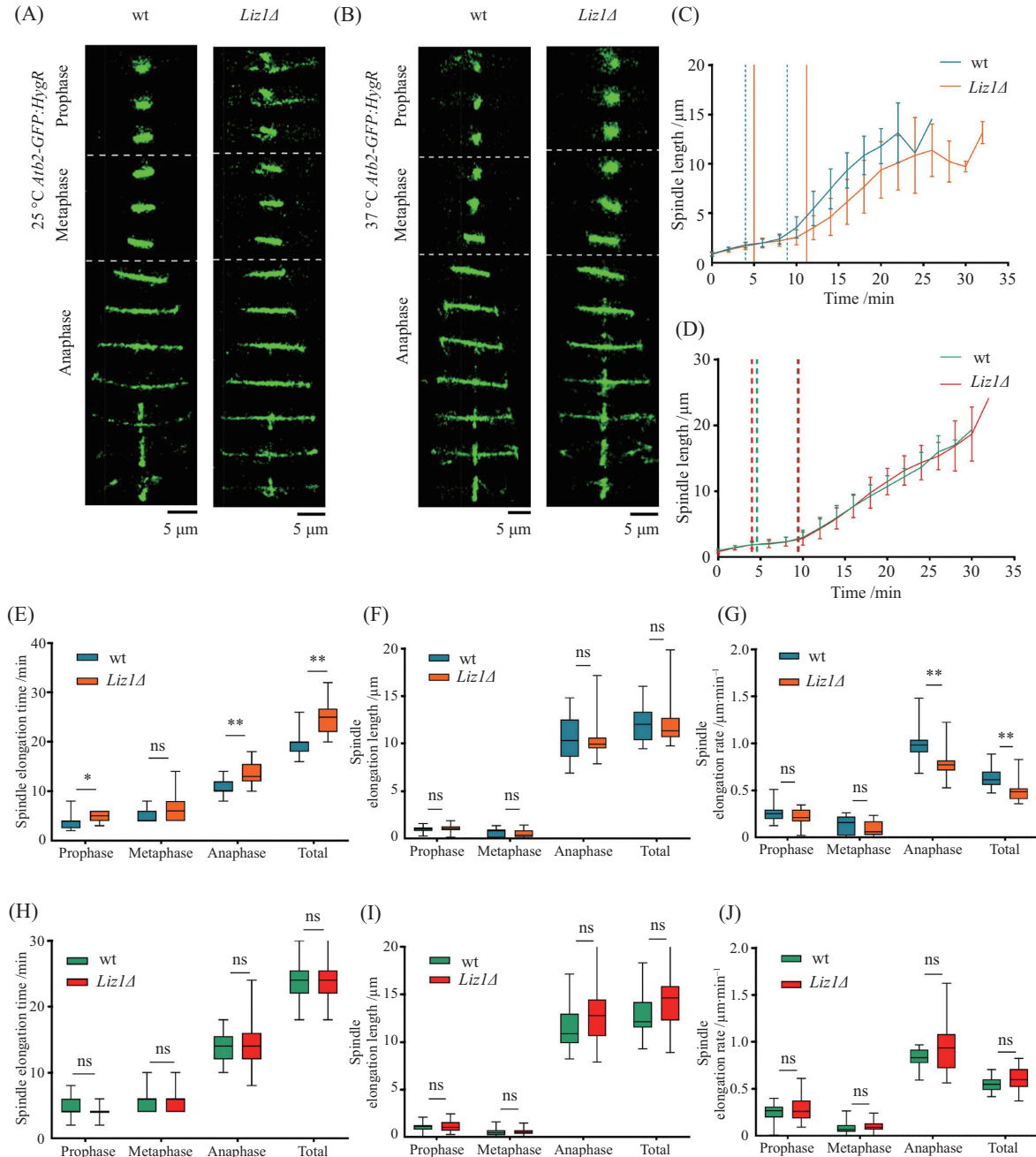


A: 25 °C下野生型菌株和*Liz1Δ*菌株间期微管的形态学图像; B: 25 °C下野生型菌株和*Liz1Δ*菌株间期微管束数目比($n=60$); C: 25 °C下野生型菌株和*Liz1Δ*菌株间期微管束长度($n=60$); D: 37 °C下野生型菌株和*Liz1Δ*菌株间期微管的形态学图像; E: 37 °C下野生型菌株和*Liz1Δ*菌株间期微管束数目比($n=60$); F: 37 °C下野生型菌株和*Liz1Δ*菌株间期微管束长度($n=60$); G: 野生型菌株和*Liz1Δ*菌株Western blot微管蛋白表达图; H: 野生型菌株和*Liz1Δ*菌株Western blot微管蛋白表达结果图; I: 野生型菌株和*Liz1Δ*菌株荧光强度对比图($n=20$)。ns $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: morphological images of wild-type and *Liz1Δ* strains expressing GFP-Atb2 (tubulin) during interphase at 25 °C; B: microtubules number ratio of wild-type and *Liz1Δ* strains during interphase at 25 °C ($n=60$); C: microtubule length of wild-type and *Liz1Δ* strains during interphase at 25 °C ($n=60$); D: time-lapse images of wild-type and *Liz1Δ* strains during interphase at 37 °C; E: microtubules number ratio of wild-type and *Liz1Δ* strains during interphase at 37 °C ($n=60$); F: microtubule length of wild-type and *Liz1Δ* strains during interphase at 37 °C ($n=60$); G: Western blot α-Tubulin expression plots of wild-type and *Liz1Δ* strains; H: Western blot results of the expression levels of Tubulin in wild-type and *Liz1Δ* strains; I: comparison of fluorescence intensity of wild-type and *Liz1Δ* strains ($n=20$). ns $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图3 *Liz1*基因缺失对粟酒裂殖酵母间期微管的影响

Fig.3 Effect of *Liz1* gene deletion on microtubules during interphase in fission yeast



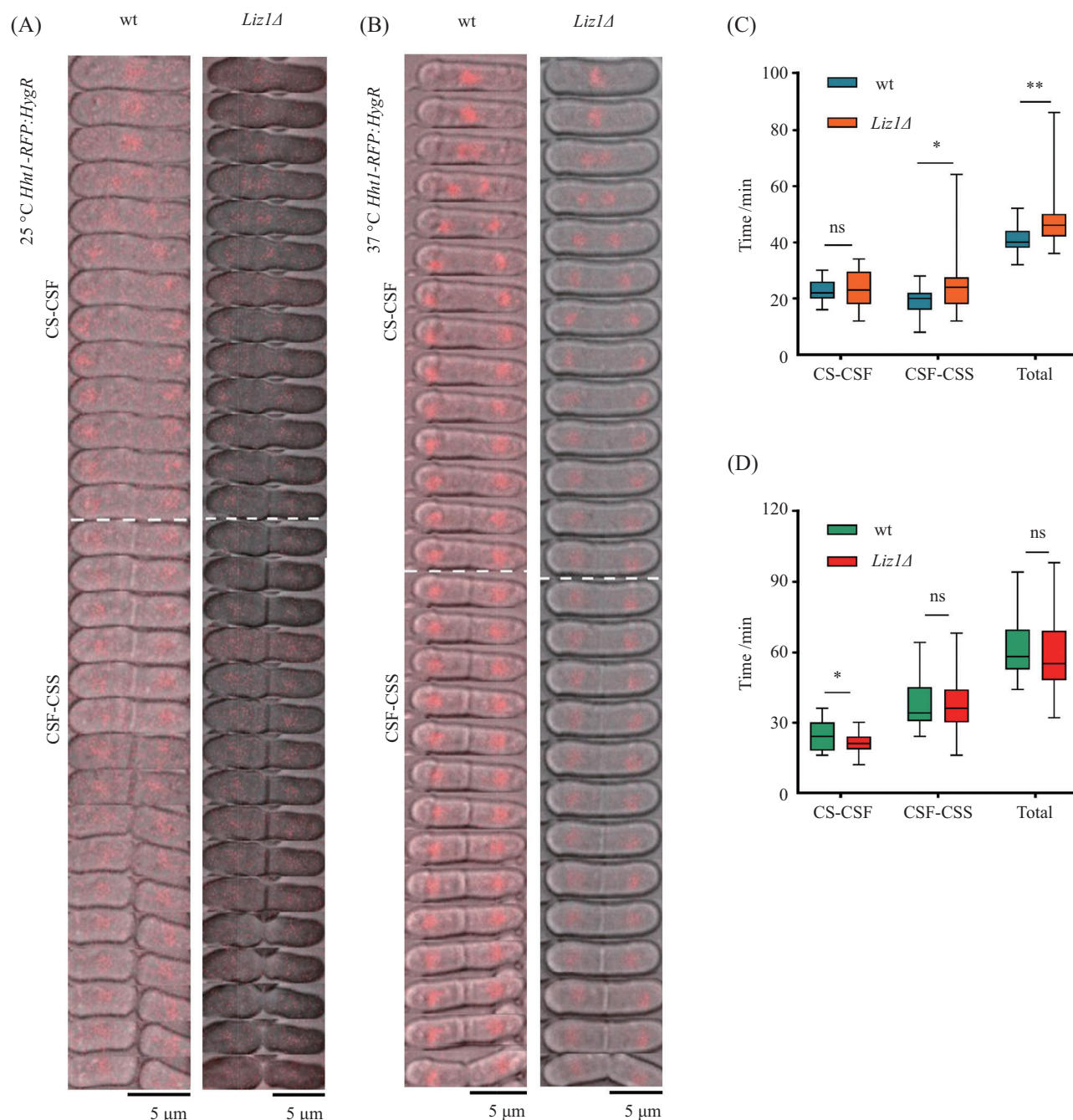
A: 25 °C 下野生型菌株和 *Liz1Δ* 菌株有丝分裂纺锤体的延时图像(120 s/帧); B: 37 °C 下野生型菌株和 *Liz1Δ* 菌株有丝分裂纺锤体的延时图像(120 s/帧); C: 25 °C 下野生型菌株和 *Liz1Δ* 菌株有丝分裂期纺锤体长度随时间变化的曲线图($n=20$); D: 37 °C 下野生型菌株和 *Liz1Δ* 菌株有丝分裂期纺锤体长度随时间变化的曲线图($n=20$); E: 25 °C 下野生型菌株和 *Liz1Δ* 菌株有丝分裂期各时期时间比较($n=20$); F: 25 °C 下野生型菌株和 *Liz1Δ* 菌株有丝分裂期各阶段纺锤体伸长长度比较($n=20$); G: 25 °C 下野生型菌株和 *Liz1Δ* 菌株有丝分裂期各时期纺锤体伸长速率比较($n=20$); H: 37 °C 下野生型菌株和 *Liz1Δ* 菌株有丝分裂期纺锤体各时期时间的比较($n=20$); I: 37 °C 下野生型菌株和 *Liz1Δ* 菌株有丝分裂期纺锤体伸长长度的比较($n=20$); J: 37 °C 下有丝分裂期纺锤体伸长速率的比较($n=20$). $^{ns}P>0.05$, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, 与野生型菌株相比。

A: time-lapse images of mitotic spindles in wild-type and *Liz1Δ* strains at 25 °C (120 s/frame); B: time-lapse images of mitotic spindles in wild-type and *Liz1Δ* strains at 37 °C (120 s/frame); C: comparative analysis of mitotic spindle elongation dynamics in wild-type and *Liz1Δ* strains at 25 °C ($n=20$); D: comparative analysis of mitotic spindle elongation dynamics in wild-type and *Liz1Δ* strains at 37 °C ($n=20$); E: comparative analysis of mitotic spindle elongation time in wild-type and *Liz1Δ* strains at 25 °C ($n=20$); F: comparative analysis of mitotic spindle elongation lengths in wild-type and *Liz1Δ* strains at 25 °C ($n=20$); G: comparative analysis of mitotic spindle elongation rates in wild-type and *Liz1Δ* strains at 25 °C ($n=20$); H: comparative analysis of mitotic spindle elongation time in wild-type and *Liz1Δ* strains at 37 °C ($n=20$); I: comparative analysis of mitotic spindle elongation lengths in wild-type and *Liz1Δ* strains at 37 °C ($n=20$); J: comparative analysis of mitotic spindle elongation rates in wild-type and *Liz1Δ* strains at 37 °C ($n=20$).

$^{ns}P>0.05$, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ compared with wt group.

图4 *Liz1* 基因缺失对粟酒裂殖酵母有丝分裂纺锤体的影响

Fig.4 Effect of *Liz1* gene deletion on spindle during mitosis in fission yeast



A: 25 °C下有丝分裂野生型菌株和*Liz1Δ*菌株的染色体延时图像(120 s/帧); B: 37 °C下有丝分裂野生型菌株和*Liz1Δ*菌株的染色体延时图像(120 s/帧); C: 25 °C下有丝分裂野生型菌株和*Liz1Δ*菌株的染色体各时期时间的比较($n=20$); D: 37 °C下有丝分裂野生型菌株和*Liz1Δ*菌株的染色体各时期时间的比较($n=20$)。 $^{ns}P>0.05$, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, 与野生型菌株相比。

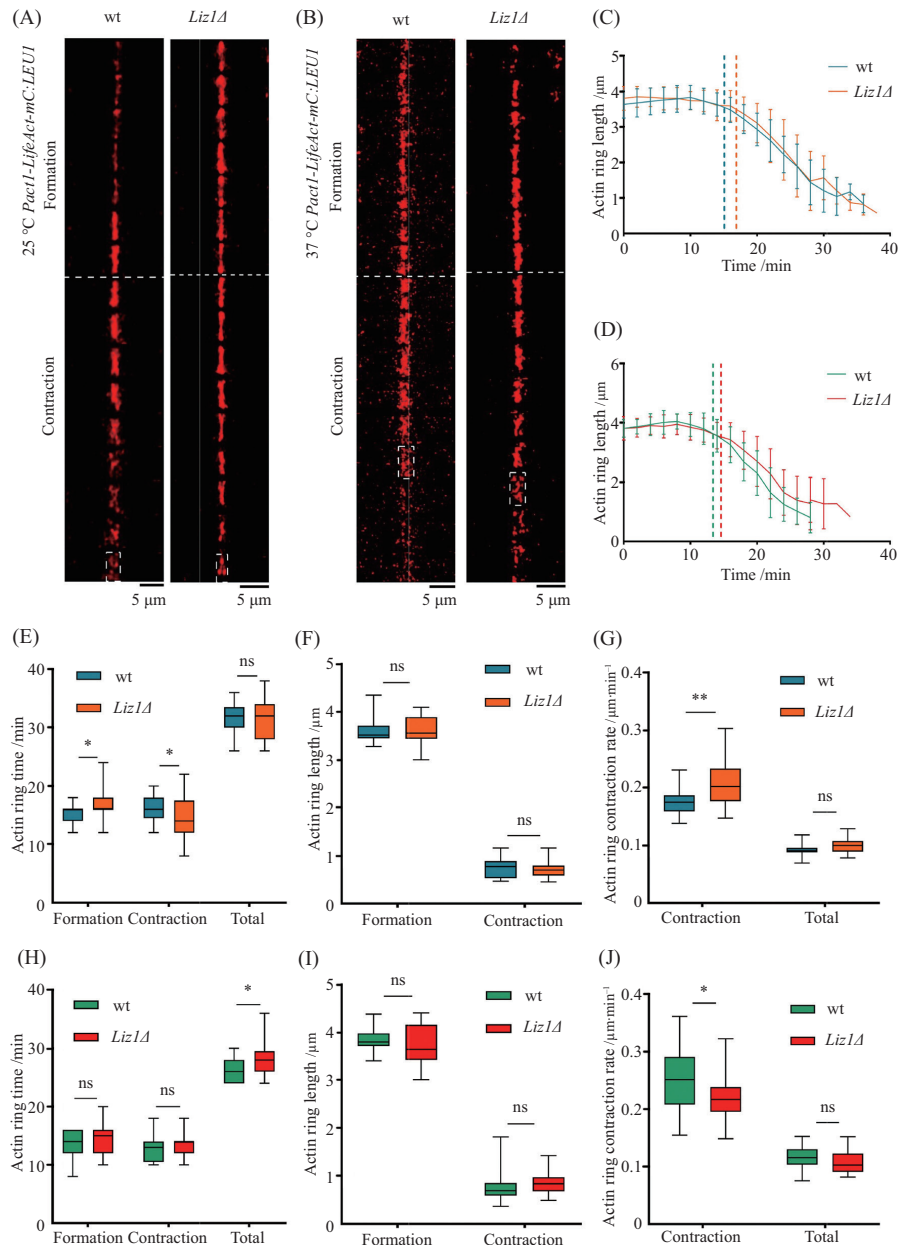
A: comparative analysis of mitotic chromosomes segregation in wild-type and *Liz1Δ* strains at 25 °C (120 s/frame); B: time-lapse image of mitotic chromosomes segregation in wild-type and *Liz1Δ* strains at 37 °C (120 s/frame); C: comparative analysis of mitotic chromosomes segregation time in wild-type strain and *Liz1Δ* strain at 25 °C ($n=20$); D: comparative analysis of mitotic chromosomes segregation time in wild-type strain and *Liz1Δ* strain at 37 °C ($n=20$). $^{ns}P>0.05$, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ compared with wt group.

图5 *Liz1*基因缺失对粟酒裂殖酵母有丝分裂期染色体的影响

Fig.5 Effect of *Liz1* gene deletion on chromosome during mitosis in fission yeast

生型菌株的肌动蛋白环的形成时间、收缩时间、形成速率和收缩速率, 以及肌动蛋白环的收缩长度(图 6E~图 6G)。发现 *Liz1Δ* 菌株较野生型菌株的肌

动蛋白环形成时间延缓(1.80 ± 0.09) min($P<0.05$), 收缩时间减少(2.20 ± 0.96) min($P<0.05$)(图 6F), 收缩速率加快(0.04 ± 0.01) μm/min($P<0.01$)(图 6G), 肌



A: 25 °C 下野生型菌株和 *Liz1Δ* 菌株有丝分裂肌动蛋白延时图像(120 s/帧); B: 37 °C 下野生型菌株和 *Liz1Δ* 菌株有丝分裂肌动蛋白延时图像(120 s/帧); C: 25 °C 下野生型菌株和 *Liz1Δ* 菌株有丝分裂肌动蛋白环长度随时间变化的曲线图($n=20$); D: 37 °C 下野生型菌株和 *Liz1Δ* 菌株有丝分裂期肌动蛋白环长度随时间变化的曲线图($n=20$); E: 25 °C 下野生型菌株和 *Liz1Δ* 菌株有丝分裂期肌动蛋白环各时期时间的比较($n=20$); F: 25 °C 下野生型菌株和 *Liz1Δ* 菌株有丝分裂期肌动蛋白环各时期环长度的比较($n=20$); G: 25 °C 下野生型菌株和 *Liz1Δ* 菌株有丝分裂期肌动蛋白环各时期速率的比较($n=20$); H: 37 °C 下野生型菌株和 *Liz1Δ* 菌株有丝分裂期肌动蛋白环各时期时间的比较($n=20$); I: 37 °C 下野生型菌株和 *Liz1Δ* 菌株有丝分裂期肌动蛋白各时期环长度的比较($n=20$); J: 37 °C 下野生型菌株和 *Liz1Δ* 菌株有丝分裂期肌动蛋白环各时期速率的比较($n=20$)。 $^{ns}P>0.05$, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, 与野生型菌株相比。虚线方框为肌动蛋白环收缩的最后一帧。

A: time-lapse images of mitotic actin in wild-type and *Liz1Δ* strains at 25 °C (120 s/frame); B: time-lapse images of mitotic actin in wild-type and *Liz1Δ* strains at 37 °C (120 s/frame); C: comparative analysis of mitotic actin ring kinetic curve in wild-type and *Liz1Δ* strains at 25 °C ($n=20$); D: comparative analysis of mitotic actin ring kinetic curve in wild-type and *Liz1Δ* strains at 37 °C ($n=20$); E: comparative analysis of mitotic actin ring formation and contraction time in wild-type and *Liz1Δ* strains at 25 °C ($n=20$); F: comparative analysis of mitotic actin ring length in wild-type and *Liz1Δ* strains at 25 °C ($n=20$); G: comparative analysis of mitotic actin ring formation and contraction rate in wild-type and *Liz1Δ* strains at 25 °C ($n=20$); H: comparative analysis of mitotic actin ring formation and contraction time in wild-type and *Liz1Δ* strains at 37 °C ($n=20$); I: comparative analysis of mitotic actin ring length in wild-type and *Liz1Δ* strains at 37 °C ($n=20$); J: comparative analysis of mitotic actin ring formation and contraction rate in wild-type and *Liz1Δ* strains at 37 °C ($n=20$). $^{ns}P>0.05$, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ compared with wt group. The dashed box represents the final frame of actin ring contraction.

图6 *Liz1* 基因缺失对粟酒裂殖酵母有丝分裂肌动蛋白的影响

Fig.6 Effect of *Liz1* gene deletion on actin rings during mitosis in fission yeast

动蛋白环形成长度和收缩长度无显著差异。分析 37 °C 下 *Liz1Δ* 菌株与野生型菌株的肌动蛋白环形成时间、收缩时间、形成速率和收缩速率(图 6H~图 6J), 发现 *Liz1Δ* 菌株较野生型菌株总时间显著增加 (1.60 ± 0.79) min ($P < 0.05$)(图 6H), 收缩期速率显著减慢 (0.04 ± 0.02) $\mu\text{m}/\text{min}$ ($P < 0.05$)(图 6J)。结果表明, 在标准温度下 *Liz1* 基因的缺失导致肌动蛋白环形成延缓, 高温胁迫下 *Liz1* 基因的缺失则导致肌动蛋白环的形成和收缩总时间均延缓。

3 讨论

粟酒裂殖酵母进入有丝分裂期后, 微管及其相关蛋白形成动态双极纺锤体^[17-18], 精准捕获姐妹染色单体^[19], 并在有丝分裂后期随着纺锤体的伸长, 纺锤体牵引着染色体准确分离到两个子细胞^[20-21]。在有丝分裂后期纺锤体通过驱动蛋白马达 Cut7(kinesin-5 family plus-end directed microtubule motor, bimC sub-family Cut7)^[22-23]和 Klp9 产生向外的力驱动后期纺锤体快速伸长^[24-25], 并由微管交联剂 Ase1(antiparallel microtubule cross-linking factor)维持纺锤体的反平行结构^[26-27]。Cut7 作用于纺锤体极体(spindle pole body, SPB), 分离驱动纺锤体移向正确位置, 保证纺锤体的双极性^[28]。Cut7 的失活会形成单极纺锤体, 导致有丝分裂无法进入后期。Cut7 产生的向外力与驱动蛋白 14(kinesin-14 family minus-end directed microtubule motor, Pkl1)产生相反作用力, 共同参与调控纺锤体的双极性, 保证染色体准确分离^[29]。在 Cut7 和 Pkl1 同时失活时^[29-30], Klp9 通过 C-端结构域内的核定位信号, 依赖性定位到细胞核内的纺锤体中间区, 并由微管正端聚合酶 Dis1(defective in sister chromatid disjoining)和 Ase1 共同募集到中间区, 确保 Klp9 正常促进纺锤体伸长^[31-32]。Cut7、Klp9、Ase1、Dis1 缺失均会导致后期纺锤体伸长速率降低, 染色体分离异常^[33]。Cut7 和 Pkl1 同时失活还会导致纺锤体组装检查点(SAC)延迟, 染色体捕获和分离时间增加^[29-30]。Dis1 和 Ase1 共同促进微管束的形成和稳定, 平衡细胞核的微管聚合力, 保持细胞核在细胞的几何中心动态生长^[27]。缺失 Dis1 会减少 8% 间期微管束数量, 降低微管束形成的稳定性^[34]。缺失 Ase1 会缩短间期微管束间距以及降低双侧微管束的稳定性, 导致细胞核无法动态定位在细胞中心, 而错位的细胞核最终导致胞质分裂过程中收缩环和隔膜错位^[27]。同时

缺失 Dis1 和 Ase1 会导致间期微管散乱分布, 无法对齐细胞长轴^[34]。本研究发现, *Liz1* 基因缺失导致有丝分裂后期纺锤体伸长时间延缓 15%, 后期伸长速率降低 22%, 胞质分裂时间延缓 22%, 间期微管束数量减少 12%。以上结果表明, *Liz1* 亦共同参与调控有丝分裂后期纺锤体伸长, 影响染色体的捕获和分离, 以及胞质分裂过程。

肌动蛋白环(cytokinetic actomyosin ring, CAR)是一种蛋白质复合物, 在粟酒裂殖酵母胞质分裂时, 通过多次搜索、捕获、拉取和释放的 SCPR 机制(the search, capture, pull, and release, SCPR)组装形成肌动蛋白环^[35-36]。在 SCPR 机制中, 细胞动力学形成蛋白 Cdc12(cytokinetic formin 12)被募集到细胞分裂节点后, 与原肌球蛋白 Cdc8(tropomyosin 8)和 α -肌动蛋白 Ain1(alpha-actinin 1)共同形成稳定的肌动蛋白丝^[37-38], 并在细胞分裂节点将肌动蛋白丝聚集成核^[15]。之后 Cdc12 与原肌动结合蛋白 Cdc3(profilin)结合, 共同促进肌动蛋白丝延长^[39], 使肌球蛋白 II 分子 Myo2(myosin II heavy chain)更容易捕获成核的肌动蛋白丝并加快成核的肌动蛋白丝的聚集^[40], 从而提高了肌动蛋白环组装效率。但为避免成核的肌动蛋白丝之间过度拉近出现团状结构^[41], Cdc12 或 Myo2 会持续发生解离释放拉近的肌动蛋白丝, 也可以通过丝切蛋白 Adf1(actin depolymerizing factor, cofilin)拆卸拉近的肌动蛋白丝, 完成一次 SCPR 过程^[42]。肌动蛋白丝通过循环进行 SCPR 过程, 以此形成稳定的动态肌动蛋白环完成后续的胞质分裂^[15]。与野生型菌株相比, Myo2、Ain1 缺失均会延缓肌动蛋白环的组装。本研究发现, 在标准温度下, *Liz1* 基因缺失会导致有丝分裂后期肌动蛋白环组装时间延缓 12%。而有丝分裂后期也是纺锤体伸长的时期, 且后期伸长速率降低 22%, 最终导致胞质分裂时间延缓 22%。综上所述表明, *Liz1* 基因缺失导致细胞有丝分裂异常主要出现在有丝分裂后期, 且关键调控机制为延缓纺锤体的伸长及肌动蛋白环组装。

Liz1 基因缺失主要影响有丝分裂纺锤体和肌动蛋白动力学。*Liz1* 基因缺失导致有丝分裂后期纺锤体伸长和肌动蛋白环的形成显著延缓, 最终导致细胞生长缓慢。本研究结果揭示了 *Liz1* 基因缺失对细胞有丝分裂影响的作用机制, 为深入了解 *Liz1* 蛋白在有丝分裂中的功能提供了一定的理论依据。

参考文献 (References)

- [1] ASAKAWA K, KUME K, KANAI M, et al. The V260I mutation in fission yeast alpha-tubulin *Atb2* affects microtubule dynamics and *EB1-Mal3* localization and activates the *Bub1* branch of the spindle checkpoint [J]. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(3): 1421-35.
- [2] SALAS-PINO S, DAGA R R. Spatiotemporal control of spindle disassembly in fission yeast [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(18): 3543-51.
- [3] HAYLES J, WOOD V, JEFFERY L, et al. A genome-wide resource of cell cycle and cell shape genes of fission yeast [J]. *Open Biol*, 2013, doi: 10.1098/rsob.130053.
- [4] YAFFE M P, HARATA D, VERDE F, et al. Microtubules mediate mitochondrial distribution in fission yeast [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(21): 11664-8.
- [5] MEADOWS J C, LANCASTER T C, BUTTRICK G J, et al. Identification of a Sgo2-dependent but Mad2-independent pathway controlling anaphase onset in fission yeast [J]. *Cell Rep*, 2017, 18(6): 1422-33.
- [6] MATSUYAMA A, ARAI R, YASHIRODA Y, et al. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* [J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(7): 841-7.
- [7] STOLZ J, CASPARI T, CARR A M, et al. Cell division defects of *Schizosaccharomyces pombe* *Liz1*-mutants are caused by defects in pantothenate uptake [J]. *Eukaryot Cell*, 2004, 3(2): 406-12.
- [8] RODRÍGUEZ-LÓPEZ M, BORDIN N, LEES J, et al. Broad functional profiling of fission yeast proteins using phenomics and machine learning [J]. *eLife*, 2023, doi: 10.7554/eLife.88229.
- [9] GRAML V, STUDERA X, LAWSON J L D, et al. A genomic multiprocess survey of machineries that control and link cell shape, microtubule organization, and cell-cycle progression [J]. *Dev Cell*, 2014, 31(2): 227-39.
- [10] MOYNIHAN E B, ENOCH T. *Liz1p*, a novel fission yeast membrane protein, is required for normal cell division when ribonucleotide reductase is inhibited [J]. *Mol Biol Cell*, 1999, 10(2): 245-57.
- [11] GUO Y, LEI B, DENG X, et al. Large scale screening of genetic interaction with *Sg73⁺* in fission yeast [J]. *Yi Chuan*, 2014, 36(7): 723-31.
- [12] ASLETT M, WOOD V. Gene ontology annotation status of the fission yeast genome: preliminary coverage approaches 100% [J]. *Yeast*, 2006, 23(13): 913-9.
- [13] KRÜGER L K, GÉLIN M, JI L, et al. Kinesin-6 Klp9 orchestrates spindle elongation by regulating microtubule sliding and growth [J]. *eLife*, 2021, doi: 10.7554/eLife.67489.
- [14] 张丁, 段江波, 潘凤, 等. *Ubr1* 基因缺失对粟酒裂殖酵母有丝分裂动力学的影响 [J]. 广西科学 (ZHANG D, DUAN J B, PAN F, et al. Effect of *Ubr1* gene deletion on mitotic dynamics in *Schizosaccharomyces pombe* [J]. *Guangxi Sciences*), 2024, 31(3): 459-68.
- [15] 刘梦楠, 白鑫, 余雯, 等. 细胞分裂周期蛋白73基因缺失抑制粟酒裂殖酵母细胞的有性生殖和有丝分裂 [J]. 中国生物化学与分子生物学报 (LIU M N, BAI X, YU W, et al. The cell division cycle 73 gene (*Cdc73*) deletion mutant inhibits sexual reproduction and mitosis of fission yeast cells [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*), 2024, 40(6): 807-18.
- [16] MARTÍN-GARCÍA R, VALDIVIESO M H. The fission yeast Chs2 protein interacts with the type-II myosin Myo3p and is required for the integrity of the actomyosin ring [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(13): 2768-79.
- [17] BLANGY A, LANE H A, D'HÉRIN P, et al. Phosphorylation by P34Cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation *in vivo* [J]. *Cell*, 1995, 83(7): 1159-69.
- [18] ENOS A P, MORRIS N R. Mutation of a gene that encodes a kinesin-like protein blocks nuclear division in *A. nidulans* [J]. *Cell*, 1990, 60(6): 1019-27.
- [19] HAGAN I, YANAGIDA M. Novel potential mitotic motor protein encoded by the fission yeast *Cut7⁺* gene [J]. *Nature*, 1990, 347(6293): 563-6.
- [20] HECK M M, PEREIRA A, PESAVENTO P, et al. The kinesin-like protein KLP61F is essential for mitosis in *Drosophila* [J]. *J Cell Biol*, 1993, 123(3): 665-79.
- [21] LE GUELLEC R, PARIS J, COUTURIER A, et al. Cloning by differential screening of a *Xenopus* cDNA that encodes a kinesin-related protein [J]. *Mol Cell Biol*, 1991, 11(6): 3395-8.
- [22] HOYT M A, HE L, LOO K K, et al. Two *Saccharomyces cerevisiae* kinesin-related gene products required for mitotic spindle assembly [J]. *J Cell Biol*, 1992, 118(1): 109-20.
- [23] ROOF D M, MELUH P B, ROSE M D. Kinesin-related proteins required for assembly of the mitotic spindle [J]. *J Cell Biol*, 1992, 118(1): 95-108.
- [24] BIELING P, TELLEY I A, SURREY T. A minimal midzone protein module controls formation and length of antiparallel microtubule overlaps [J]. *Cell*, 2010, 142(3): 420-32.
- [25] SUBRAMANIAN R, WILSON-KUBALEK E M, ARTHUR C P, et al. Insights into antiparallel microtubule crosslinking by PRC1, a conserved nonmotor microtubule binding protein [J]. *Cell*, 2010, 142(3): 433-43.
- [26] JANSON M E, LOUGHLIN R, LOÏDICE I, et al. Crosslinkers and motors organize dynamic microtubules to form stable bipolar arrays in fission yeast [J]. *Cell*, 2007, 128(2): 357-68.
- [27] LOÏDICE I, STAUB J, SETTY T G, et al. *Ase1p* organizes antiparallel microtubule arrays during interphase and mitosis in fission yeast [J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(4): 1756-68.
- [28] YAMASHITA A, SATO M, FUJITA A, et al. The roles of fission yeast *Ase1* in mitotic cell division, meiotic nuclear oscillation, and cytokinesis checkpoint signaling [J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(3): 1378-95.
- [29] PIDOUX A L, LEDIZET M, CANDE W Z. Fission yeast Pkl1 is a kinesin-related protein involved in mitotic spindle function [J]. *Mol Biol Cell*, 1996, 7(10): 1639-55.
- [30] SAUNDERS W, LENGUEL V, HOYT M A. Mitotic spindle function in *Saccharomyces cerevisiae* requires a balance between different types of kinesin-related motors [J]. *Mol Biol Cell*, 1997, 8(6): 1025-33.
- [31] YUKAWA M, KAWAKAMI T, OKAZAKI M, et al. A microtubule polymerase cooperates with the kinesin-6 motor and a microtubule cross-linker to promote bipolar spindle assembly in the absence of kinesin-5 and kinesin-14 in fission yeast [J]. *Mol Biol Cell*, 2017, 28(25): 3647-59.
- [32] FU C, WARD J J, LOIODICE I, et al. Phospho-regulated interaction between kinesin-6 Klp9p and microtubule bundler *Ase1p*

- promotes spindle elongation [J]. *Dev Cell*, 2009, 17(2): 257-67.
- [33] YUKAWA M, OKAZAKI M, TERATANI Y, et al. Kinesin-6 Klp9 plays motor-dependent and -independent roles in collaboration with Kinesin-5 Cut7 and the microtubule crosslinker Ase1 in fission yeast [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7336.
- [34] ROQUE H, WARD J J, MURRELLS L, et al. The fission yeast XMAP215 homolog Dis1p is involved in microtubule bundle organization [J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e14201.
- [35] LEE I J, COFFMAN V C, WU J Q. Contractile-ring assembly in fission yeast cytokinesis: recent advances and new perspectives [J]. *Cytoskeleton*, 2012, 69(10): 751-63.
- [36] TYREE Z L, BELLINGHAM-JOHNSTUN K, MARTINEZ-BAIRD J, et al. The myosin-V Myo51 and alpha-actinin Ain1p cooperate during contractile ring assembly and disassembly in fission yeast cytokinesis [J]. *J Fungi*, 2024, doi: 10.3390/jof10090647.
- [37] CHEN Q, POLLARD T D. Actin filament severing by cofilin dismantles actin patches and produces mother filaments for new patches [J]. *Curr Biol*, 2013, 23(13): 1154-62.
- [38] MCCOLLUM D, GOULD K L. Timing is everything: regulation of mitotic exit and cytokinesis by the MEN and SIN [J]. *Trends Cell Biol*, 2001, 11(2): 89-95.
- [39] COFFMAN V C, NILE A H, LEE I J, et al. Roles of formin nodes and myosin motor activity in Mid1p-dependent contractile-ring assembly during fission yeast cytokinesis [J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(24): 5195-210.
- [40] STARK B C, SLADEWSKI T E, POLLARD L W, et al. Tropomyosin and myosin-II cellular levels promote actomyosin ring assembly in fission yeast [J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(6): 989-1000.
- [41] VAVYLONIS D, WU J Q, HAO S, et al. Assembly mechanism of the contractile ring for cytokinesis by fission yeast [J]. *Science*, 2008, 319(5859): 97-100.
- [42] RINCON S A, PAOLETTI A. Mid1/anillin and the spatial regulation of cytokinesis in fission yeast [J]. *Cytoskeleton*, 2012, 69(10): 764-77.