

研究报告

巴斯德毕赤酵母 Orm1 蛋白在细胞生长和内质网
功能维持方面的功能

梁晨 张萌 喻其林 邢来君 李明春*

(南开大学生命科学学院微生物系 分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津 300071)

摘要:【目的】鉴定巴斯德毕赤酵母 *ORM1* 基因; 研究 *ORM1* 基因缺失对毕赤酵母生长、内质网压力应答、细胞钙稳态调节和活性氧水平等方面的影响。【方法】利用生物信息学软件对毕赤酵母 Orm1 蛋白进行序列比对和分析; 利用 PCR 介导的同源重组法构建 *orm1Δ* 缺失菌株, 将回补质粒 pIB1-*ORM1* 转入 *orm1Δ* 菌株构建回补菌株; 研究 *ORM1* 基因缺失对毕赤酵母生长的影响; 以 Fluo-3 AM 染色法测定胞质钙含量; 以 DCFH-DA 染色法分析胞内活性氧水平; 以实时荧光定量 PCR 技术研究 *ORM1* 基因缺失对毕赤酵母非折叠蛋白应答、钙稳态和抗氧化系统基因表达的影响; 使用试剂盒分析毕赤酵母抗氧化系统过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活性及谷胱甘肽(GSH)的含量。【结果】在毕赤酵母基因组数据库中比对出酿酒酵母 Orm1 和 Orm2 的同源蛋白, 并将该蛋白编码基因命名为 *ORM1*; 毕赤酵母 *ORM1* 基因缺失导致细胞生长受到明显抑制, 对衣霉素引起的内质网压力敏感性增强, 非折叠蛋白应答激活, 细胞钙稳态紊乱, 活性氧积累, 抗氧化系统激活。【结论】由于非折叠蛋白应答、钙稳态调节、活性氧积累等均与内质网功能息息相关, 因此, 巴斯德毕赤酵母 *ORM1* 基因编码的 Orm1 蛋白在细胞生长及内质网正常功能的维持过程中发挥重要作用。

关键词: 巴斯德毕赤酵母, Orm, 内质网压力, 钙稳态, 活性氧

Function of *Pichia pastoris* Orm1 in cell growth and endoplasmic
reticulum function maintenance

LIANG Chen ZHANG Meng YU Qi-Lin XING Lai-Jun LI Ming-Chun*

(Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Department of Microbiology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to identify the *ORM1* gene in *Pichia pastoris*, and to illustrate the effect of its deletion on cell growth, endoplasmic reticulum stress response, cell calcium homeostasis and reactive oxygen species accumulate on. [Methods] Sequence alignment and analysis were done by the relevant bioinformatic software. The *orm1Δ* mutant was constructed by PCR-mediated

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31270096)

*Corresponding author: Tel: 86-22-23508506; E-mail: nklimingchun@163.com

Received: October 14, 2016; Accepted: January 03, 2017; Published online (www.cnki.net): January 10, 2017
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31270096)

*通讯作者: Tel: 86-22-23508506; E-mail: nklimingchun@163.com

收稿日期: 2016-10-14; 接受日期: 2017-01-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-01-10

gene disruption, and the reconstituted strain *orm1Δ+ORM1* was constructed by transforming *orm1Δ* with the pIB1-*ORM1* plasmid. The growth rates of the strains were detected using both liquid and the solid media. Gene expression related to the unfolded protein response, calcium homeostasis and antioxidant system was detected via real-time PCR. The activity of antioxidant enzymes, including catalase and superoxide dismutase, and the content of reduced glutathione were measured by relevant kits. **[Results]** The *P. pastoris ORM1* gene sharing high homology with *S. cerevisiae ORM1* and *ORM2*, was identified in *P. pastoris* genome database. Deletion of *ORM1* caused growth defect, increased sensitivity to endoplasmic reticulum stress caused by tunicamycin, activation of unfolded protein response, disturbance of calcium homeostasis, reactive oxygen species accumulation, and activation of the antioxidant system. **[Conclusion]** Because unfolded protein response, calcium homeostasis, and production of reactive oxygen species are all correlated with ER function, *P. pastoris* Orm1 protein plays critical roles in cell growth and maintenance of ER functions.

Keywords: *Pichia pastoris*, Orm, Endoplasmic reticulum stress, Calcium homeostasis, Reactive oxygen species

鞘脂是构成细胞膜结构的重要组成成分,是细胞中三大膜脂(磷脂、鞘脂、固醇)之一,是细胞的重要结构组分和信号分子,可调节膜的流动性。鞘脂合成的稳态对细胞正常生长代谢过程至关重要^[1]。Orosomucoids (ORM, α -酸性糖蛋白,血清类黏蛋白)是 *ORM* 和 *ORMDL* (*ORM*-like)基因编码的内质网膜蛋白,它们属于一类进化上高度保守的内质网整合膜蛋白家族,广泛存在于真核生物中^[2]。在酿酒酵母中,基因相互作用图谱表明 *ORM* 基因的产物是鞘脂合成的负调控因子^[3],其作用机制是通过与鞘脂从头合成的限速酶丝氨酸棕榈酰基转移酶(Serine palmitoyltransferase, SPT)直接结合,对该酶起负调控作用,抑制鞘氨醇的从头合成^[3]。酿酒酵母中有两个 Orm 蛋白,分别为 Orm1 和 Orm2,均定位于内质网,二者有重叠功能,它们与 SPT 酶的三个亚基 Lcb1、Lcb2、Tsc3 和磷酸肌醇磷酸酶 Sac1 组成 SPOTS 复合物^[3]。酿酒酵母中 Orm 蛋白的活性和含量受到细胞的精密调节,主要是表达水平和磷酸化调节^[4]。Orm 蛋白通过介导鞘脂稳态而影响膜结构的生物发生以及胞内的信号转导、营养应答等过程,在细胞的生长中起重要作用。

内质网压力可诱导非折叠蛋白应答(Unfolded protein response, UPR)。脂类稳态的改变是诱导 UPR 的原因之一,脂类稳态失衡可在不引起蛋白质错误折叠的情况下诱导 UPR^[5]。酿酒酵母中的 UPR 激活完全依赖于 Ire1 途径:Ire1p 受到激活后,具有

Ser/Thr 激酶活性的 C 端胞质结构域可互相聚合,激活 C 端另一个 RNase 结构域;活化的 RNase 结构域剪切 *HAC1* 的前体 mRNA 中一个 252 bp 的特殊内含子,再由 Rlg1p 将剪切后的 *HAC1* mRNA 拼接起来,形成具有翻译活性的 *Hac1ⁱmRNA*;由 *Hac1ⁱmRNA* 翻译而来的 *Hac1ⁱp* 是转录活化因子,可进入细胞核与靶基因中诱导转录必需的未折叠蛋白反应元件序列结合,启动 *KAR2*、*PDII* 等靶基因的转录^[6-8]。除 UPR 途径之外,酵母细胞中由钙调神经磷酸酶(Calcineurin, CaN)介导的钙细胞存活(Calcium cell survival, CCS)途径也是应答内质网压力的一条重要途径,细胞钙稳态的变动会影响 CCS 途径,影响钙应答基因的表达^[9]。

在细胞中活性氧(Reactive oxygen species, ROS)有两个主要来源:一是线粒体呼吸,二是内质网中 UPR 调控的氧化折叠机制。UPR 的持续激活将通过内质网中的氧化蛋白折叠反应导致胞内 ROS 积累^[10]。作为分泌蛋白加工的重要场所,内质网可通过二硫键的氧化和还原产生 ROS:在二硫键形成过程中,通过一系列巯基-二硫键交换反应,电子将从底物蛋白的巯基转移到蛋白二硫异构酶 Pdi1p,接着转移到 Ero1p,最后传递给分子氧。在分子氧的还原过程中 ROS 往往作为副产物产生^[11]。

巴斯德毕赤酵母作为一种重要的真核外源蛋白表达载体,具有重要的工业价值,也是一种重要的真核模式生物。脂类的组成与含量与细胞代谢息

息相关,但目前有关巴斯德毕赤酵母的研究主要集中在如何提高外源蛋白表达产量上,对其自身的脂类代谢调控网络及相关调控因子的研究仍有空白,仅有的鞘脂合成相关研究也主要集中在酿酒酵母所缺乏的复杂鞘脂葡萄糖基神经酰胺的合成上^[12]。在酿酒酵母中 Orm1 和 Orm2 蛋白参与了胞内多种代谢^[3-4],因此,对巴斯德毕赤酵母 Orm1 蛋白功能的研究有助于人们了解 ORMDL 家族蛋白在毕赤酵母生长代谢中的作用,从而更好地发挥其工业应用价值,同时补充了真核微生物的鞘脂代谢方面的研究。

本研究通过序列比对在巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)基因组数据库中发现了酿酒酵母 Orm1 和 Orm2 的同源蛋白,命名为 Orm1,并将其编码基因命名为 *ORM1*。进而探究了 Orm1 蛋白在毕赤酵母生长、内质网压力应答、细胞钙稳态和氧化压力应答方面发挥的作用,为进一步研究 *ORM1* 基因及其所调控的鞘脂代谢对细胞生长和压力应答的影响奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验菌株、质粒和引物

巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)野生型菌株 GS115 (*his4⁻ Mut⁺*) 购自 Invitrogen;大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株作为亚克隆宿主菌,由本实验室保存;本研究中以 PCR 介导的同源重组法构建 *orm1 Δ* 缺失菌株,将回补质粒 pIB1-*ORM1* 转入 *orm1 Δ* 缺失菌株以获得 *ORM1* 基因回补菌株 *orm1 Δ +ORM1*。本研究所用引物见表 1。

1.2 主要试剂和仪器

多球壳菌素(Myriocin),生工生物工程(上海)有限公司;衣霉素(Tunicamycin),Bio Basic 公司;Eastep 总 RNA 提取试剂盒、M-MLV 反转录酶,普洛麦格(北京)生物技术有限公司;Oligo-dT、RNA 酶抑制剂, TaKaRa 公司;SYBR-Green qPCR 扩增试剂盒, TransGen 公司;过氧化氢酶(CAT)酶活性检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)酶活性检测试剂盒、谷胱甘肽(GSH)含量测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;Fluo-3 AM、DCFH-DA、焦炭酸

二乙酯(DEPC)等,北京鼎国生物技术有限责任公司。其余试剂及药品皆为国产分析纯。

恒温培养箱,天津市机电有限公司;恒温摇床,江苏太仓市实验设备厂;紫外-可见分光光度计,瑞典 Pharmacia Biotech 公司;多功能酶标仪, PerkinElmer 公司;Eppendorf 实时荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.3 培养基

YPD 培养基(g/L):酵母提取物 10.0,蛋白胨 20.0,葡萄糖 20.0;SC 培养基(g/L):酵母无氮氨基酸源 6.7,葡萄糖 20.0,各种氨基酸混合物 2.0。按要求在 YPD 固体平板中添加不同浓度 Myriocin、H₂O₂、CaCl₂、EGTA。

1.4 实验方法

1.4.1 生长曲线测定:将过夜培养活化的 GS115、*orm1 Δ* 和 *orm1 Δ +ORM1* 菌株转接至 50 mL YPD 培养基中,调整 OD₆₀₀ 为 0.1,30 °C、160 r/min 振荡培养,每 2 h 取样一次测定 OD₆₀₀,绘制生长曲线图。

1.4.2 药物敏感性测定:将过夜培养的 GS115、*orm1 Δ* 和 *orm1 Δ +ORM1* 菌株转接至 YPD 培养基中,调整 OD₆₀₀=0.1,按每组 5 个平行管、每管 200 μ L 分装于灭菌的干燥 1.5 mL 离心管内,实验组加入 2、3、4 mg/L 的衣霉素处理,对照组加入等量无菌水,置于 30 °C 培养箱中静置培养 24 h,测定 OD₆₀₀,绘制比生长率图。

1.4.3 RNA 的提取和基因相对表达量的测定:将培养过夜的 GS115、*orm1 Δ* 和 *orm1 Δ +ORM1* 菌株转接至 YPD 或 SC 培养基中,培养至对数期,收集菌体,无菌水洗涤之后液氮速冻。以 Eastep 总 RNA 提取试剂盒提取毕赤酵母细胞总 RNA,并反转录为 cDNA。以 SYBR-Green qPCR 扩增试剂盒进行实时荧光定量 PCR 检测,以 β -actin 内参基因校正表达量,基因相对表达量以 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法计算。

1.4.4 胞质钙含量测定:将培养过夜的 GS115、*orm1 Δ* 和 *orm1 Δ +ORM1* 菌株转接至 YPD 培养基中,调整 OD₆₀₀=0.1,培养至对数期收集菌体,用 HBSS 洗涤 3 次后,加入 5 μ L 钙离子荧光探针 Fluo-3 AM

表 1 实验所用引物
Table 1 List of primers used in this study

Primers	Sequence (5'→3')	Size (bp)
ORM1-5DR	GGAAAGATTGGAGCCAGTGAG	21
ORM1-1	GAAGCTATGGTGTGTGGGGCTGTGTTAAGGATATATCG	38
ORM1-5ZEO	AGCCCCACACACCATAGCTTC	21
ORM1-3ZEO	CTGCACCACAGCTTGCAAATTAAGCC	27
ORM1-2	GGCTTTAATTGCAAGCTGTGGTGCAGTCTGTGTTGAC	38
ORM1-3DR	CGCTACTGATACCTGTGGAC	20
ORM1-3inner	CTGAAAATCGGAATAGATCGT	22
ORM1-5COM	CGGAATTCACAGACAAAGTATTTATTTATTG	31
ORM1-3COM	CCGCTCGAGATGTACCCAGGTTTCATA	26
Real-PPACT-F	GGTCCCCTTATTTCCAG	20
Real-PPACT-R	TCCTTCAGTTTTTCCGTCTC	20
IRE1-5RT	AGCCCTTGGTTTCTGTGTC	19
IRE1-3RT	ATCTCTCCAGTCCATCCCGA	20
INO1-5RT	TGACAAGGCAAGATACACCG	20
INO1-3RT	GACCTACCAGCAACAAACCC	20
PMT4-5RT	GTCTCGTTCTGTGACTTCAACC	22
PMT4-3RT	GCCAACACCAGCAAATAATAGC	22
PDI1-5RT	GAACCTGTTTCTGCTGCCG	19
PDI1-3RT	CAATGCTTTGGCTCTGTCTT	20
KAR2-5RT	AAGTCGGGTCGTGTAGAAAT	20
KAR2-3RT	CGCTTCAAGTCTCTTTGGA	19
CCH1-5RT	TCAGAAACAAATCAGCCCCG	19
CCH1-3RT	AGTGGGCATTGTCCTTGAC	19
CNB1-5RT	TTTGACGAAGATGGCGGT	18
CNB1-3RT	TCAGATTCCCACCAACCA	18
PMR1-5RT	TCTGTTACTGATGGGTTCCG	20
PMR1-3RT	GCCTCCAATGATTTCTCGG	19
PMC1-5RT	CCGTCCACACTATCAAGTCTG	21
PMC1-3RT	AGTATGTTCTCTCCGTATCTCTCG	24
CRZ1-5RT	CTTCCTCCAAACGCTTCTTT	20
CRZ1-3RT	GTATTGGTTGAAGTCTTGGGC	21
RT-cSOD-5	CGAACAATCCTCCGAAAG	18
RT-cSOD-3	ACCCTTGGCAACACCTTCA	19
RT-mSOD-5	AAACAAGGAGGTGGAGAGC	19
RT-mSOD-3	CAAAGGGACCAAACTACC	18
RT-CAT-5	GCTACTAACCTGAAGGACGC	20
RT-CAT-3	TTGAAGTTTACGACACCCAG	20
RT-GPX1-5	CCCATTAGATAAGAAAGGCG	20
RT-GPX1-3	CCAAACTGGTTACAGGGAA	19
GLR1-5RT	AACTTCGCCCCAACCGTAT	18
GLR1-3RT	TCTCAATCGCCAAGGACT	18
TRR1-5RT	TTATTGCCACTGGTGCCT	18
TRR1-3RT	CCTCCAACAACGTCCAAAG	19
RT-YAP1-5	GGAAGCCAAGCACAAGGTA	19
RT-YAP1-3	TCCATACAGAGCCCCATCAAT	20

染料(1 g/L), 避光孵育 1 h; 收集细胞, HBSS 洗涤 3 次, 以酶标仪测定荧光强度, 所得结果与菌液 OD_{600} 的比值即代表胞质钙含量。

1.4.5 ROS 含量测定: 将培养过夜的 GS115、*orm1Δ* 和 *orm1Δ+ORM1* 菌株转接至 YPD 培养基中, 调整 $OD_{600}=0.1$, 培养至对数期, 实验组加入 2 mg/L 衣霉素, 对照组加入等量无菌水, 处理 2 h, 收集菌体, 用 PBS 洗涤 3 次后, 加入 5 μ L 2',7'-二氯二氢荧光黄二乙酸酯 (2',7'-Dichlorodihydro fluorescein diacetate, DCFH-DA) 染料(1 g/L), 避光孵育 30 min; 收集细胞, PBS 洗涤 3 次, 以酶标仪测定荧光强度, 所得结果与菌液 OD_{600} 的比值即代表胞内 ROS 水平。

1.4.6 CAT 酶活性、SOD 酶活性、GSH 含量测定: 将培养过夜的 GS115、*orm1Δ* 和 *orm1Δ+ORM1* 菌株转接至 YPD 培养基中, 调整 $OD_{600}=0.1$, 培养至对数期, 收集菌体, 加入玻璃微珠、50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、1 mmol/L 苯甲基磺酰氟, 以液氮研磨法提取胞内总蛋白, 测定 CAT 酶活性、SOD 酶活性、GSH 含量。

1.4.7 Folch 方法测定酵母提取物中的总脂类含量: 称取一定质量酵母提取物(Yeast extract), 每 1 g 样品中加入 20 mL 体积比为 2:1 的氯仿/甲醇, 室温下振荡 15–20 min。过滤, 取滤液, 加入 16 mL (0.2 倍体积) 生理盐水洗涤 2–3 次。2 000 r/min 离心 10 min, 取下层有机相, 真空蒸发溶剂。称取所得物质量, 计算产率。

2 结果与分析

2.1 毕赤酵母 Orm1 蛋白的鉴定

酿酒酵母 Orm1 和 Orm2 蛋白属于一个保守的真核生物内质网膜蛋白家族(ORMDL), 该家族蛋白主要参与了细胞鞘脂合成稳态的调控^[2-3]。从结构上看, ORMDL 家族蛋白在其氨基酸序列的中部一般含 3–4 个跨膜结构域, 与动物、植物相比, 酵母(包括酿酒酵母、粟酒裂殖酵母等)中的 Orm 蛋白 N 端多出 20–60 个氨基酸残基, 该家族蛋白虽无已知的功能结构域, 但其序列高度保守^[2]。从功能方面来看, 酿酒酵母 *orm1Δorm2Δ* 双缺失菌株的生长受到

严重抑制、对二硫苏糖醇(DTT)、衣霉素、CaCl₂、EGTA、SDS 等试剂敏感^[2]。通过序列比对在巴斯德毕赤酵母基因组数据库中找到一个与酿酒酵母 Orm1 和 Orm2 同源的蛋白。用 DNAMAN 软件进行序列比对表明, 该蛋白与酿酒酵母 ScOrm1 的氨基酸序列具有较高相似性(68.29%), 此外与酿酒酵母 ScOrm2 的氨基酸序列具有 62.58% 的相似性(图 1A)。因此, 将毕赤酵母中该蛋白命名为 Orm1, 相应的编码基因命名为 *ORM1*。

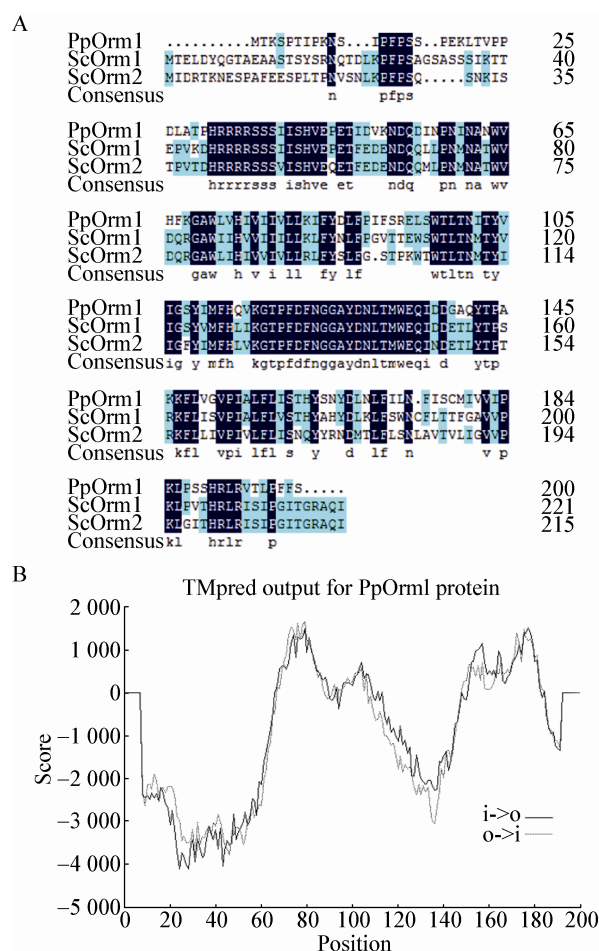


图 1 巴斯德毕赤酵母 Orm1 蛋白序列分析

Figure 1 Sequence analysis of *Pichia pastoris* Orm1 protein

注: A: DNAMAN 软件对巴斯德毕赤酵母 Orm1 蛋白进行序列分析; B: 用 TMpred 在线工具对毕赤酵母 Orm1 蛋白进行跨膜结构域分析。

Note: A: Sequence analysis of *Pichia pastoris* Orm1 by DNAMAN; B: Transmembrane domain analysis of *Pichia pastoris* Orm1 via online TMpred tools.

此外,通过 TMpred 在线工具(http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED_form_parser)对 Orm1 蛋白序列进行跨膜结构分析(图 1B),发现 Orm1 蛋白有 4 个可能的跨膜结构域,分别是 69–88, 97–113, 148–166, 168–187。与酿酒酵母 Orm1 蛋白(84–107, 112–130, 163–181, 185–205)和 Orm2 蛋白(79–99, 104–121, 153–173, 179–200)跨膜区数量一致,位置相近。综上,毕赤酵母 Orm1 蛋白与酿酒酵母 Orm1 和 Orm2 同源程度高,具有多个相似的保守氨基酸位点和跨膜结构域,与 ScOrm1 和 ScOrm2 属于同一保守的内质网整合膜蛋白家族。

2.2 *ORM1* 基因缺失影响毕赤酵母生长

在 YPD 液体培养基中,与野生型菌株及回补菌株相比, *orm1Δ* 缺失菌株表现出生长缓慢的特点(图 2A)。与此相似,在 YPD 固体平板上, *orm1Δ* 缺失菌株形成的菌落偏小(图 2B)。为了进一步研究 *orm1Δ* 缺失菌株生长缓慢是否由胞内鞘脂合成紊乱所致,在固体 YPD 培养基中添加多球壳菌素(Myriocin),分析其对上述菌株生长的影响。该药物是鞘氨醇的结构类似物,含量极微时即可抑制 SPT 酶的活性^[13]。如图 2B 所示,在加入 50 μg/L Myriocin 的固体平板上, *orm1Δ* 缺失菌株的生长得以恢复,表明 *orm1Δ* 缺失菌株生长缓慢与胞内鞘脂从头合成紊乱相关。

2.3 Orm1 蛋白参与内质网压力应答

内质网是真核生物细胞内蛋白质和脂类的主要合成场所,脂类合成紊乱可导致内质网压力,激活非折叠蛋白反应(Unfolded protein response, UPR)^[5]。我们推测 *ORM1* 基因缺失可能造成的鞘脂稳态紊乱会进一步增加内质网压力,因此研究了 *ORM1* 基因缺失对细胞内质网功能造成的影响。如图 3A 所示,在不同浓度衣霉素(Tunicamycin)处理条件下,与野生型相比, *orm1Δ* 缺失菌株的生长受到明显抑制,并且具有剂量依赖的特点。

我们进而研究了毕赤酵母中 *ORM1* 基因缺失对 UPR 应答基因表达的影响。如图 3B 所示,在 YPD

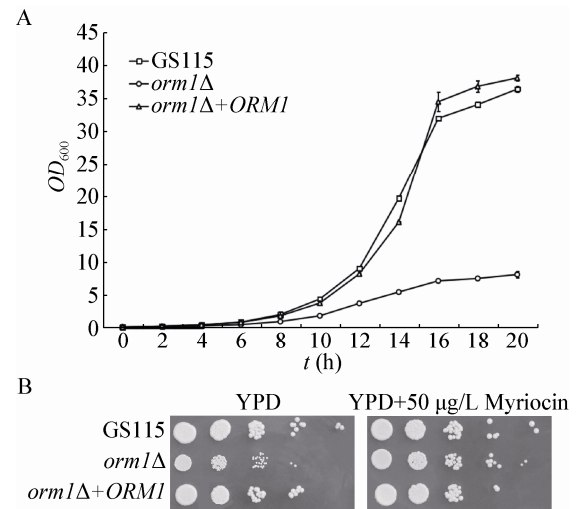


图 2 *ORM1* 基因缺失对毕赤酵母生长的影响

Figure 2 Effect of *ORM1* deletion on the growth of *P. pastoris*

注: A: 在 30 °C YPD 液体培养基培养条件下 GS115、*orm1Δ* 和 *orm1Δ+ORM1* 的生长情况; B: 在 YPD 和 YPD+50 μg/L Myriocin 固体培养基上 GS115、*orm1Δ* 和 *orm1Δ+ORM1* 的生长情况。

Note: A: Growth situation of GS115, *orm1Δ* and *orm1Δ+ORM1* in liquid YPD medium at 30 °C; B: Serial dilution strain of GS115, *orm1Δ* and *orm1Δ+ORM1* were spotted onto plates of YPD and YPD plus 50 μg/L myriocin.

培养条件下仅 *INO1* 基因表达量显著升高。在酿酒酵母和白念珠菌中,YPD 和 SC 合成培养基由于其营养成分的不同,将对所培养菌株的代谢、表型、基因表达造成不同程度的影响^[14–15]。因此,针对上述结果,考虑到 YPD 中的营养成分较为丰富,推测其中可能含有大量脂类营养物质,这部分脂类营养物质干扰了培养于其中的毕赤酵母的 UPR 基因表达。因此,提取了 YPD 培养基组分之一——酵母提取物(Yeast extract)中的总脂类成分并分析其含量。从 4.00 g 酵母提取物中提取得到 0.60 g 淡黄色固体粉末状物质,产率为 15.00%。这表明 YPD 培养基中的确存在脂类营养物质,且含量较高。

因此,为了排除这部分干扰,检测了不含脂类营养物的 SC 合成培养基中各 UPR 基因的表达情况,结果发现与对照菌株相比, *orm1Δ* 缺失菌株中 *IRE1*、*INO1*、*PDH1*、*KAR2* 四种 UPR 基因的表达量均显著升高(图 3C)。

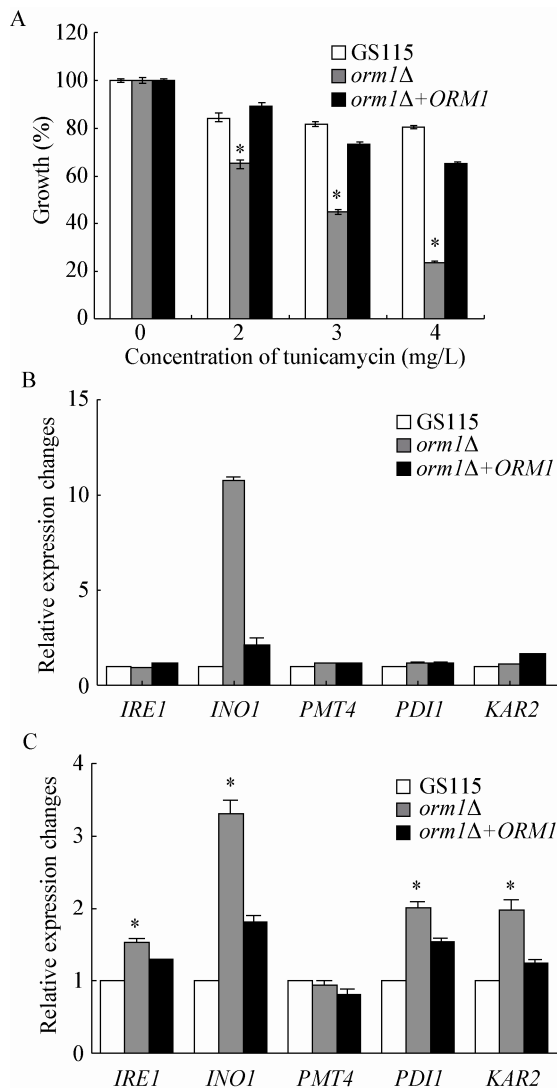


图3 *ORM1* 基因缺失对细胞内质网功能的影响

Figure 3 Effect of *ORM1* deletion on ER function

注: A: *orm1Δ* 对衣霉素的敏感性具有剂量依赖性; B、C: 实时荧光定量 PCR 法分析 UPR 基因相对表达量, 菌株分别培养于 YPD 培养基(B)或 SC 合成培养基(C)。*: *orm1Δ* 和 WT 之间差异性显著($P < 0.05$)。

Note: A: Sensitivity of *orm1Δ* to tunicamycin is dose-dependent; B, C: Expression level changes of UPR genes were analyzed by real-time PCR. Cells were cultured in YPD (B) or SC (C) medium. *: Significant difference between *orm1Δ* and WT ($P < 0.05$).

综上所述, 推测 Orm1 蛋白在毕赤酵母内质网功能维持方面发挥作用, *ORM1* 基因缺失将造成内质网功能紊乱, 进而激活 UPR 途径。

2.4 Orm1 蛋白参与胞内钙稳态调控

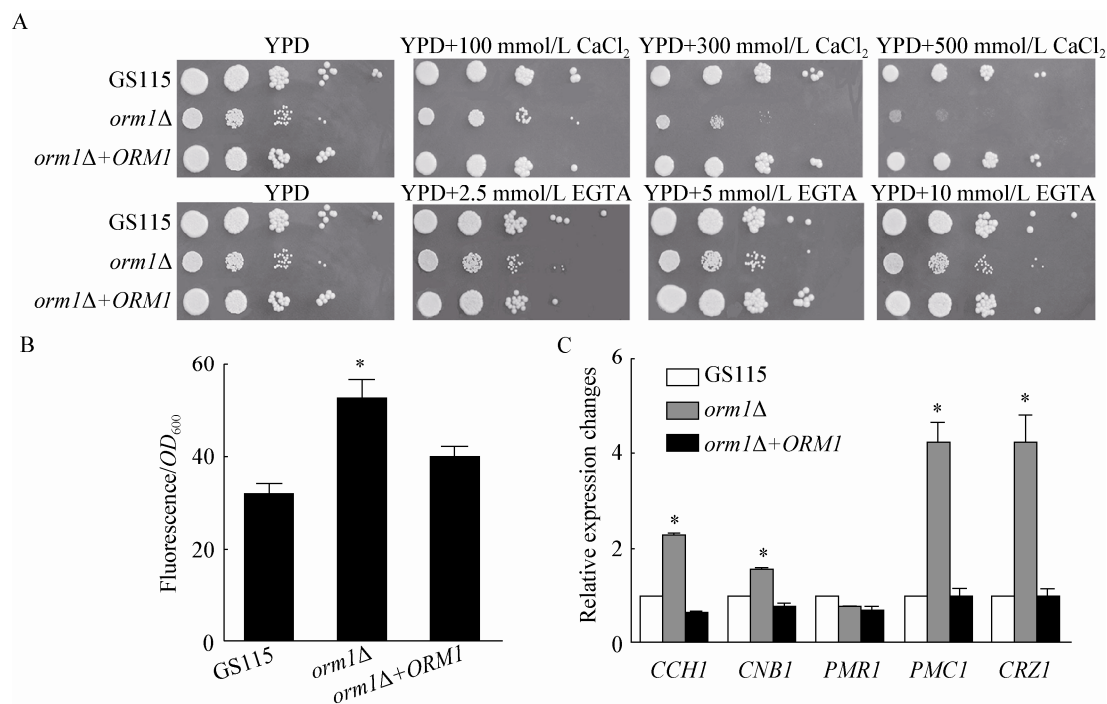
在酿酒酵母中, Orm2 蛋白的表达受到钙调神

经磷酸酶(Calcineurin, CaN)介导的钙细胞存活(Calcium cell survival, CCS)途径的调控^[4]。本研究继而探讨了 *ORM1* 基因与钙信号途径的关系。结果发现, *orm1Δ* 缺失菌株对 CaCl_2 造成的高钙条件表现出剂量依赖的敏感性(图 4A)。同时, 其在 YPD 培养条件下所测定的胞质钙含量明显高于野生型(图 4B)。此外, 在 *orm1Δ* 菌株中, 潜在的 CCS 途径应答基因 *CCH1*、*CNBI*、*CRZ1*、*PMCI* 的表达量均有显著升高(图 4C)。以上结果表明, Orm1 蛋白在一定程度上参与了细胞的钙稳态调节。由于内质网是细胞中 Ca^{2+} 离子储存的重要场所, 联系 *orm1Δ* 缺失菌株对内质网压力的敏感性, *ORM1* 基因缺失对细胞钙稳态的影响可能与该基因的缺失影响了内质网功能有关。

2.5 *ORM1* 基因缺失导致胞内 ROS 积累及胞内抗氧化系统激活

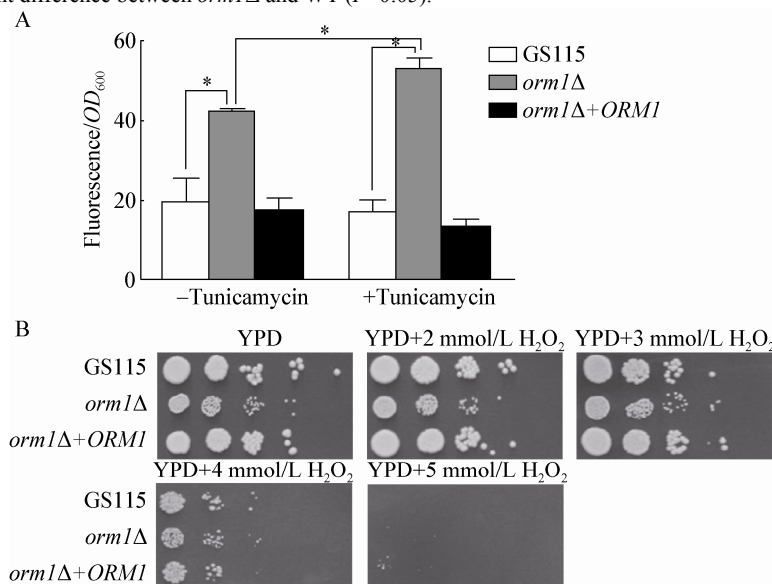
大量研究表明, UPR 可通过造成 ROS 积累进而促发细胞凋亡^[10]。为了探究 *ORM1* 基因缺失对胞内 ROS 水平的影响, 以 DCFH-DA 染色法对毕赤酵母胞内 ROS 水平进行了分析。结果表明, 在 YPD 培养条件下, 与野生型菌株相比, *orm1Δ* 缺失菌株胞内 ROS 含量明显升高; 在 2 mg/L 衣霉素处理条件下, 胞内 ROS 含量进一步升高(图 5A)。据此, 研究了 *orm1Δ* 缺失菌株对 H_2O_2 的敏感性。然而, 随着 H_2O_2 浓度的升高, 与对照菌株相比, *orm1Δ* 缺失菌株并未表现出对 H_2O_2 的敏感性, 即 *ORM1* 基因的缺失并不影响毕赤酵母对 H_2O_2 的耐受性(图 5B)。

根据上述结果, 推测 *ORM1* 基因的缺失激活了毕赤酵母细胞抗氧化系统, 因而进一步测定了 *orm1Δ* 缺失菌株中抗氧化系统基因表达和主要酶活性的变化。结果发现 *orm1Δ* 缺失菌株中, 胞内参与 ROS 清除和氧化压力应答基因的表达量(图 6A)、过氧化氢酶(CAT)活性(图 6B)、超氧化物歧化酶(SOD)活性(图 6C)、谷胱甘肽(GSH)含量(图 6D)均显著上升。这表明 *orm1Δ* 缺失菌株中抗氧化系统可能并未受到损伤, 这在一定程度上能够解释虽然 *orm1Δ*

图4 *ORM1* 基因缺失对细胞钙稳态的影响Figure 4 Effect of *ORM1* deletion on calcium homeostasis

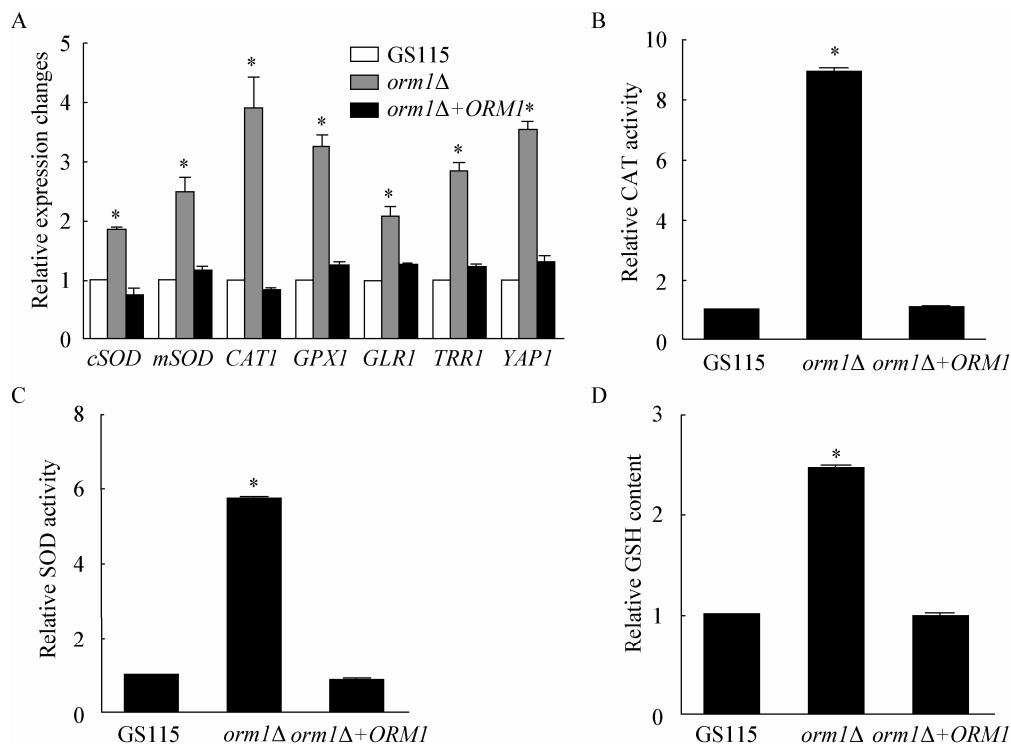
注：A：*orm1*Δ 缺失菌株对高钙(CaCl₂)、低钙(EGTA)条件的敏感性；B：GS115、*orm1*Δ 和 *orm1*Δ+*ORM1* 菌株在 YPD 培养条件下测定的胞质钙含量；C：实时荧光定量 PCR 法分析钙应答基因相对表达量。*：差异显著($P<0.05$)。

Note: A: Sensitivity of *orm1*Δ to high calcium (CaCl₂) and low calcium (EGTA); B: Cytoplasmic calcium contents were measured in GS115, *orm1*Δ and *orm1*Δ+*ORM1* strain under YPD culture condition; C: The expression level changes of calcium response genes were measured by real-time PCR. *: Significant difference between *orm1*Δ and WT ($P<0.05$).

图5 *ORM1* 基因缺失对胞内 ROS 水平和氧化压力敏感性的影响Figure 5 Effects of *ORM1* deletion on ROS level and sensitivity to oxidative stress

注：A：GS115、*orm1*Δ 和 *orm1*Δ+*ORM1* 菌株在 YPD 和 YPD+2 mg/L 衣霉素处理下测定的胞内 ROS 水平；B：*orm1*Δ 菌株对 H₂O₂ 的敏感性。*：差异显著($P<0.05$)。

Note: A: Cellular ROS levels were measured in GS115, *orm1*Δ and *orm1*Δ+*ORM1* strain under YPD with or without 2 mg/L tunicamycin culture condition; B: Sensitivity of *orm1*Δ to H₂O₂. *: Significant difference between *orm1*Δ and WT, and *orm1*Δ with or without tunicamycin ($P<0.05$).

图 6 *ORM1* 基因缺失对抗氧化系统活性的影响Figure 6 Effects of *ORM1* deletion on activity of antioxidative system

注: A: 实时荧光定量 PCR 法分析抗氧化基因相对表达量; B-D: *ORM1* 基因缺失导致抗氧化系统激活。YPD 培养条件下, 菌株培养至对数期, 分别测定各菌株中 CAT 活性(B)、SOD 活性(C)和 GSH 含量(D)。*: 差异显著 $P < 0.05$ 。

Note: A: The expression level changes of anti-oxidant genes were perceived by real-time PCR; B-D: Cellular antioxidant system was activated in *orm1Δ* cells. Cells were cultured in YPD medium to log-phase, and cellular CAT activity (B), SOD activity (C) and GSH content (D) were analyzed. *: Significant difference between *orm1Δ* and WT ($P < 0.05$).

缺失菌株中的 ROS 显著升高, 但其对 H_2O_2 造成的外源氧化压力耐受性并未减弱的原因。

3 结论与讨论

在酿酒酵母中, Orm1 和 Orm2 蛋白可作为 TOR (Target of rapamycin) 信号途径与 CaN 信号途径共同的下游应答基因, 对营养状况、细胞鞘脂代谢、质膜状态等作出应答, 协调细胞的生长与压力应答^[4,16]。本研究通过序列比对在巴斯德毕赤酵母中找到酿酒酵母 Orm1 和 Orm2 的同源蛋白及其编码基因, 将该蛋白命名为 Orm1, 将该蛋白的编码基因命名为 *ORM1*。本研究发现, 与野生型和回补菌株相比, *orm1Δ* 菌株的生长十分缓慢, 并且这种缓慢与 *orm1Δ* 菌株中鞘脂合成紊乱有关。

在酿酒酵母中, *orm1Δorm2Δ* 菌株中 UPR 组成

型激活^[17]。脂类稳态失衡时, Ire1 可直接被触发而发生二聚化并激活, 从而起始下游的信号途径^[18]。鞘脂代谢的紊乱也会诱导 UPR 发生。有研究表明, C16-神经酰胺的堆积会诱发 UPR^[19]。抗惊厥药 2-丙基戊酸钠也能通过提高胞内神经酰胺的水平诱导 UPR^[20]。本研究发现在以 SC 培养基进行培养时, UPR 途径的应答基因 *IRE1*、*INO1*、*PDII*、*KAR2* 表达量升高, 但在高脂类含量的 YPD 培养基中培养时, 仅 *INO1* 基因的表达量升高。上述结果表明毕赤酵母中 *ORM1* 基因的缺失可导致 UPR 激活, 而 UPR 的激活程度则受到细胞可利用的脂类营养成分及含量的影响^[5]。因此, *ORM1* 基因缺失对毕赤酵母 UPR 的激活作用应该与细胞中脂类代谢失衡有关, 并受到培养基中脂类成分的影响。

在酿酒酵母中 *INO1* 基因编码的肌醇-3-磷酸合酶是细胞内肌醇从头合成途径的限速酶,该基因在从人类到酵母等多种真核生物体内保守。肌醇是磷脂酰肌醇和酵母细胞中的复杂鞘脂磷酸肌醇神经酰胺(Inositol phospharylceramide, IPC)头部基团的重要组分,肌醇水平的改变将影响多种脂类的合成^[21]。在酿酒酵母中,肌醇匮乏可直接诱导 UPR,而 *INO1* 基因的表达受 UPR 的诱导^[22]。肌醇营养缺陷对酿酒酵母 *orm1Δorm2Δ* 菌株而言是致死的^[17],而在野生型菌株中,培养基中肌醇匮乏可诱导 *ORM2* 基因的转录^[4]。在真核细胞中,磷脂和鞘脂的合成由于其共同的中间产物而相互交叉,因此有人提出鞘脂代谢受到磷酸肌醇信号途径的调控^[23]。本研究发现,*ORM1* 基因的缺失会导致 *INO1* 基因表达显著上调,表明 *ORM1* 基因缺失引起的鞘脂合成紊乱可能对磷脂等其他脂类的合成造成影响,这一点有待于继续研究。

内质网是细胞钙稳态调节的重要细胞器。有研究表明,在酿酒酵母中内质网压力通过激活 CaN 途径提高了 Orm2 的蛋白水平^[4]。本研究发现 *ORM1* 基因缺失导致细胞对高钙条件敏感、导致胞质钙离子浓度升高、激活了部分 CCS 途径应答基因的表达。这表明毕赤酵母中 *ORM1* 基因的缺失可对细胞钙稳态造成一定影响。在酿酒酵母中,内质网压力激活质膜 Cch1-Mid1 钙通道蛋白引起钙内流,导致胞质钙含量增加;增加的胞质 Ca^{2+} 离子与钙调蛋白(Calmodulin, CaM)结合激活 CaN,后者通过转录因子 Crz1 激活钙应答基因的表达^[9]。由于 *ORM1* 基因缺失后会导致内质网压力加剧,推测在巴斯德毕赤酵母中也存在类似机制。内质网压力可激活多种 CaN 途径的下游靶基因,使其参与到膜的重构中,其中就包括影响膜脂组分合成的基因,如编码复杂鞘脂甘露糖基磷酸肌醇神经酰胺(Mannosyl inositol phospharylceramide, MIPC)合酶催化亚基、调节亚基的 *SUR1*、*CSG2* 与固醇合成有关的 *ERG26* 等^[24]。因此 *ORM1* 基因对细胞钙稳态的影响可能与其对鞘脂合成的调控作用有关。

UPR 的激活会使得内质网中的氧化蛋白质发生折叠,从而导致 ROS 大量产生。本研究发现 *ORM1* 基因的缺失导致胞内 ROS 升高,并且在衣霉素造成的内质网压力条件下 ROS 水平升高更为明显。然而,*orm1Δ* 缺失菌株并未对过氧化氢所营造的氧化压力条件表现出明显的敏感性,推测与 *ORM1* 基因缺失并未破坏细胞的抗氧化系统有关。有报道称 ROS 可激活参与调控并维持细胞鞘脂稳态的 TORC2-Ypk1 信号途径^[25],因此鞘脂稳态的失衡与 ROS 在胞内的积累有着密切联系。鉴于 *ORM1* 基因缺失并未造成明显的氧化压力表型,推测 *orm1Δ* 菌株内 ROS 积累在很大程度上来源于 UPR 所诱导的内质网蛋白质氧化折叠。

总之,*ORM1* 基因所编码的 Orm1 蛋白作为细胞鞘脂从头合成的重要调控因子,在维持菌体生长、内质网功能、细胞钙稳态及胞内 ROS 水平方面扮演着重要角色,表明鞘脂在细胞生长及压力应答过程中发挥了极为重要的作用。

参 考 文 献

- [1] Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008, 9(2): 139-150
- [2] Hjelmqvist L, Tuson M, Marfany G, et al. ORMDL proteins are a conserved new family of endoplasmic reticulum membrane proteins[J]. Genome Biology, 2002, 3(6): research0027.1-0027.16
- [3] Breslow DK, Collins SR, Bodenmiller B, et al. Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis[J]. Nature, 2010, 463(7284): 1048-1053
- [4] Gururaj C, Federman RS, Chang A. Orm proteins integrate multiple signals to maintain sphingolipid homeostasis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(28): 20453-20463
- [5] Hou NS, Gutschmidt A, Choi DY, et al. Activation of the endoplasmic reticulum unfolded protein response by lipid disequilibrium without disturbed proteostasis *in vivo*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(22): E2271-E2280
- [6] Wu HX, Ng BSH, Thibault G. Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans[J]. Bioscience Reports, 2014, 34(4): e00118
- [7] Pineau L, Colas J, Dupont S, et al. Lipid-induced ER stress: synergistic effects of sterols and saturated fatty acids[J]. Traffic, 2009, 10(6): 673-690
- [8] Cox JS, Chapman RE, Walter P. The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane[J]. Molecular and Cellular Biology, 1997, 17(9): 1805-1814
- [9] Bonilla M, Nastase KK, Cunningham KW. Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress[J]. The EMBO Journal, 2002, 21(10): 2343-2353
- [10] Haynes CM, Titus EA, Cooper AA. Degradation of misfolded protein prevents ER-Derived oxidative stress and cell death[J].

- Molecular Cell, 2004, 15(5): 767-776
- [11] Tu BP, Weissman JS. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences[J]. Journal of Cell Biology, 2004, 164(3): 341-346
- [12] Ternes P, Wobbe T, Schwarz M, et al. Two pathways of sphingolipid biosynthesis are separated in the yeast *Pichia pastoris*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(13): 11401-11414
- [13] Miyake Y, Kozutsumi Y, Nakamura S, et al. Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995, 211(2): 396-403
- [14] Klose C, Surma MA, Gerl MJ, et al. Flexibility of a eukaryotic lipidome-insights from yeast lipidomics[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35063
- [15] Mahto KK, Singh A, Khandelwal NK, et al. An assessment of growth media enrichment on lipid metabolome and the concurrent phenotypic properties of *Candida albicans*[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e113664
- [16] Liu M, Huang CJ, Polu SR, et al. Regulation of sphingolipid synthesis through Orm1 and Orm2 in yeast[J]. Journal of Cell Science, 2012, 125(10): 2428-2435
- [17] Han S, Lone MA, Schneider R, et al. Orm1 and Orm2 are conserved endoplasmic reticulum membrane proteins regulating lipid homeostasis and protein quality control[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(13): 5851-5856
- [18] Volmer R, Ron D. Lipid-dependent regulation of the unfolded protein response[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2015, 33: 67-73
- [19] Epstein S, Kirkpatrick CL, Castillon GA, et al. Activation of the unfolded protein response pathway causes ceramide accumulation in yeast and INS-1E insulinoma cells[J]. The Journal of Lipid Research, 2012, 53(3): 412-420
- [20] Jadhav S, Russo S, Cottier S, et al. Valproate induces the unfolded protein response by increasing ceramide levels[J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(42): 22253-22261
- [21] Gaspar ML, Aregullin MA, Jesch SA, et al. Inositol induces a profound alteration in the pattern and rate of synthesis and turnover of membrane lipids in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(32): 22773-22785
- [22] Chang HJ, Jones EW, Henry SA. Role of the unfolded protein response pathway in regulation of *INO1* and in the *sec14* bypass mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genetics, 2002, 162(1): 29-43
- [23] Brice SE, Alford CW, Cowart LA. Modulation of sphingolipid metabolism by the phosphatidylinositol-4-phosphate phosphatase Sac1p through regulation of phosphatidylinositol in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(12): 7588-7596
- [24] Cyert MS. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 311(4): 1143-1150
- [25] Niles BJ, Joslin AC, Fresques T, et al. TOR Complex 2-Ypk1 signaling maintains sphingolipid homeostasis by sensing and regulating ROS accumulation[J]. Cell Reports, 2014, 6(3): 541-552