

酿酒酵母组蛋白乙酰化修饰及其对基因表达的调控

王明鹏 陈蕾 付加芳 鲍晓明*

(山东大学 生命科学学院 微生物技术国家重点实验室 山东 济南 250100)

摘要: 真核生物核小体组蛋白修饰引起染色质重塑(Chromatin remodeling)是表观遗传的重要调控机制。乙酰化修饰(Acetylation modification)是其中一种重要的方式。组蛋白乙酰化修饰位点集中在各种组蛋白 N 末端赖氨酸残基上。细胞内存在功能拮抗的多种乙酰基转移酶和去乙酰化酶,二者相互竞争,共同调节组蛋白的乙酰化状态,通过影响核小体结构的致密性,并在多种效应分子的参与下,实现对基因的表达调控。以真核模式生物酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为对象,综述乙酰基转移酶和去乙酰化酶的种类、作用特点以及其基因调控的分子机制等方面的最新研究进展。

关键词: 酿酒酵母, 组蛋白, 乙酰化修饰, 基因调控, 表观遗传

Histone acetylation and its role in the regulation of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*

WANG Ming-Peng CHEN Lei FU Jia-Fang BAO Xiao-Ming*

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan, Shandong 250100, China)

Abstract: In eukaryotes, histone modifications that induce chromatin remodeling are an important mechanism of epigenetic regulation, and acetylation is a crucial form of such modification. In general, the ϵ -amino groups of lysine residues of histone N-termini are subject to acetylation, which affects the structure of nucleosome. The acetylation status of histones is controlled by two kinds of functionally antagonistic enzymes, acetyltransferases and deacetylases, which are responsible for acetylation and deacetylation of histones, respectively. Each enzyme has several homologs in the cell that modify different residues of histones. Furthermore, combined with other factors, histone acetylation regulates gene expression at the epige-

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30671143, 30570031, 30740420552)

*通讯作者: ✉: bxm@sdu.edu.cn

收稿日期: 2011-10-25; 接受日期: 2011-12-12

netic level. In this review, we summarized latest research on the classification of acetyltransferases and deacetylases together with their functional characteristics regarding gene regulation in the eukaryotic model organism *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Histone, Acetylation modification, Gene regulation, Epigenetics

核基因组以高度凝缩有序的 DNA-蛋白质复合体染色质形态存在于细胞核中是真核细胞的主要特点之一。核小体结构是各种转录因子与 DNA 分子功能区识别结合的主要障碍^[1]。真核生物转录启动前,需要松散染色质核小体结构,暴露 DNA 分子功能区,以便于 RNA 聚合酶及各种转录因子的识别与结合,进而完成转录过程。核小体位置和结构变化的过程被称为染色质重塑(Chromosome remodeling),染色质重塑主要动力是对组蛋白的翻译后修饰,包括位点特异性的乙酰化、磷酸化、甲基化修饰等。修饰的组蛋白直接影响染色质结构或通过招募其他蛋白形成染色质重塑复合体,实现对染色质结构松散度的改变^[2],其中,组蛋白的乙酰化是最早发现且最为重要的基因转录表观调控因子。

组蛋白乙酰化修饰现象在生命进化过程中高度保守,从低等原核细胞到包括人在内的高等哺乳动物中普遍存在。一般认为,乙酰化修饰功能主要表现在对细胞染色质结构的影响以及对核内转录调控因子的激活方面,从上游基因组水平调控细胞活动。近来研究表明乙酰化修饰现象同样存在于代谢酶中,调节酶活力并影响代谢通路,例如糖酵解途径、糖异生途径、三羧酸循环等^[3]。由此可见,乙酰化修饰在不同物种、不同生命过程中均扮演重要角色。然而,乙酰化修饰一旦失调则会引起细胞功能紊乱,最终可能导致多种疾病甚至癌症的发生。因此,探明赖氨酸乙酰化修饰的作用靶点和调控机理,不仅有助于认识表观遗传现象,同时对新型药物的研发及人类

疾病的预防和治疗具有重大意义。

酿酒酵母作为真核模式生物,具有细胞体积小、细胞及其 DNA 结构简单、生长快、分子生物学操作体系完善等特点,是研究真核生物生命现象分子机制的良好实验平台。多种组蛋白乙酰化酶和去乙酰化酶及其作用机制最初都是在酿酒酵母中发现并揭示的,而真核生物乙酰化修饰酶的划分依据是建立在与酿酒酵母相关酶类的同源性关系比对上。组蛋白乙酰化修饰作为表观遗传调控的一种重要机制,参与调控了基因的转录和沉默、染色质凝聚、DNA 复制、胁迫应答等细胞生命过程^[4]。本文以酿酒酵母为研究对象,论述其组蛋白乙酰化修饰在基因表达调控机制方面的研究进展。

1 酿酒酵母组蛋白乙酰化修饰及其表观调控的基本特点

酿酒酵母乙酰化的特异性修饰位点主要是各种组蛋白 N-端的赖氨酸残基(图 1)。不同组蛋白有一个或多个修饰位点,而不同修饰位点被特定的修饰酶所识别。组蛋白乙酰化水平由各种乙酰基转移酶(Histone acetyltransferases, HATS)和去乙酰化酶(Histone deacetylases, HDACS)的竞争性作用共同决定。乙酰基转移酶催化乙酰基由乙酰辅酶 A 向组蛋白 N-末端的赖氨酸 ϵ -氨基基团转移。一般认为组蛋白的乙酰化是通过改变核小体的结构而激活相关基因转录的,其机理是修饰在核小体组蛋白 N-端上的乙酰基中和了其周围的正电荷,增加了组蛋白的亲水性,减弱了组蛋白

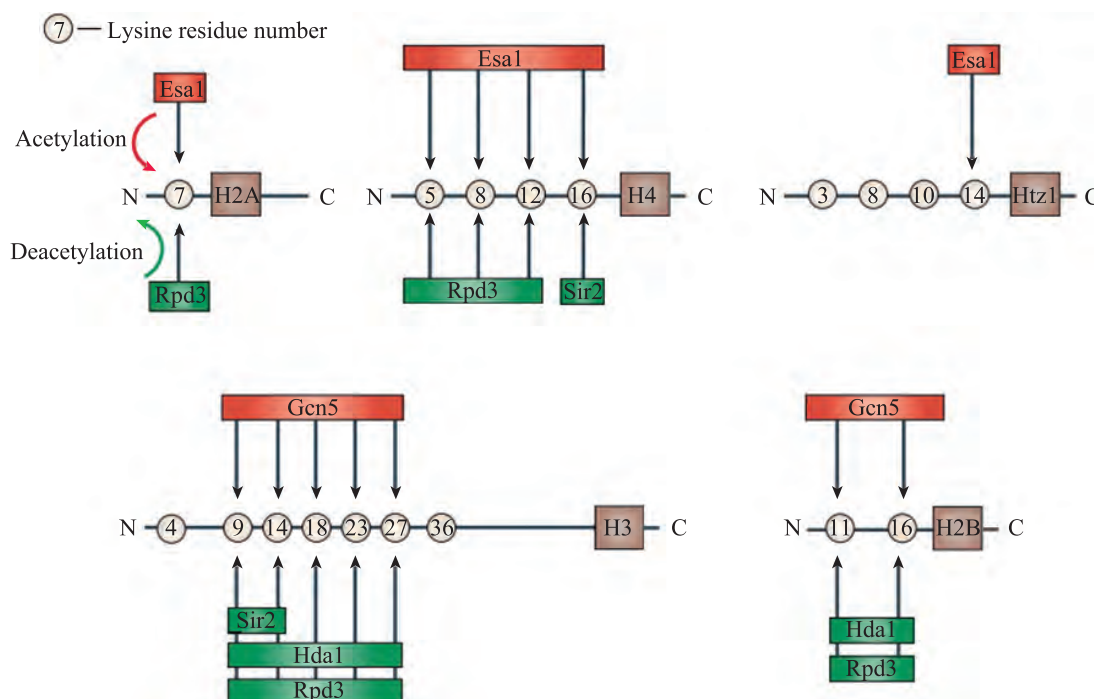


图 1 酿酒酵母中已知的组蛋白乙酰化修饰酶及其修饰的赖氨酸残基位点^[6]

Fig. 1 Known sites of histone modifications and some of the modifying enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*^[6]

与 DNA 的相互作用,促使染色质由紧密向相对松散的状态转变,暴露 DNA 分子上的功能区,利于转录因子与 DNA 的识别与结合;同时乙酰化作为一种信号可以诱导转录因子间的相互结合。例如,研究表明有许多转录激活因子都含有溴结构域(Bromodomain),这种结构域可以与乙酰化的赖氨酸相互作用,从而将转录激活因子定位于 DNA 上的基因启动子区,激活转录。相反,组蛋白去乙酰化后,核小体周围正电荷增加,与 DNA 的磷酸基所带负电荷的相互作用加强,染色质结构变得紧密而不利于转录^[5-7],使基因沉默或转录抑制。有趣的是,随着研究的深入,人们发现组蛋白乙酰化与去乙酰化修饰对基因表达的表现调控并非如此简单而规律,有时去乙酰化酶也能够引起基因的激活,例如酿酒酵母转录激活因子 Hog1p 可以招募去乙酰化酶 Rpd3p 激活渗透压胁迫应答反应相关基因的转录^[6]。同时乙酰基转

移酶对组蛋白以外的修饰底物及作用特点也逐渐被揭示。

2 酿酒酵母的乙酰基转移酶和去乙酰化酶的分类

迄今为止,在酿酒酵母中已经发现了十余种乙酰基转移酶和去乙酰化酶。在行使基因表达调控的功能时,并非自身独立作用,而是与其他转录因子、调控蛋白等共同参与形成不同的基因调控染色质重塑复合物。

2.1 乙酰基转移酶

组蛋白乙酰基转移酶是一类催化乙酰辅酶 A 的乙酰基向组蛋白赖氨酸的 ϵ -氨基基团转移的酶系。根据催化区域的序列同源性和底物特异性,酿酒酵母中的乙酰基转移酶属于 4 个家族,即 GNAT、MYST、P300/CBP 和 Basal TF,其分类与特点列于表 1。其中 GNAT 家族和 MYST 家族研

究得最为透彻^[8]。而其他真核生物的乙酰基转移酶除了这四大家族外,还存在第五大家族 Nuclear Receptor Co-factors。

GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferase)家族成员与酵母乙酰基转移酶 Gcn5p 有很高的同源性,故而得名。其酶结构都有 4 个保守区域,分别是乙酰辅酶 A 的识别结合区域,核小体的识别结合区域,蛋白作用区域和能与乙酰化赖氨酸结

合的溴结构域。MYST 家族的命名是根据其 4 个成员 MOZ、Ybf2、Sas2 和 TIP60 的首字母排序。该家族酶结构特点是都有两个保守区域,即甲基化的赖氨酸结合区域和锌指结构域。酵母乙酰基转移酶 Esa1p 属于该家族。P300/CBP 家族成员结构特性独特,包括溴结构域及介导蛋白-蛋白互作的 3 个半胱氨酸/组氨酸富集区(TAZ、PHD 和 ZZ)。酵母乙酰基转移酶 Rtt109p 属于该家族。

表 1 酿酒酵母乙酰基转移酶的分类与特点				
Table 1 Classification and characteristics of HAT families in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
HATs families	HATs in <i>S. cerevisiae</i>	HAT complex	Substrate	Function
GNAT	Gcn5	SAGA ADA SLIK /SALSA	H3/H2B H4	Coactivator DNA Repair
	Hat1	HAT-B	H4/H2A	Histone deposition Chromatin assembly Gene silencing
	Elp3	Elongator	H3/H4	Elongator Chromatin remodeling
	Hpa2		H3/H4	Unknown
MYST	Esa1	NuA4 Piccolo NuA4	H2A/H4 H3	Transcription activation Cell cycle DNA Repair
	Sas2	SAS	H4	Gene silencing
	Sas3	NuA3	H3	Transcription activation and elongation
P300/CBP	Rtt109		H3	Genome stability transcription elongation
Basal TFs	Taf1	TFIID	H3	Transcription initiation

2.1.1 Gcn5p: 由位于酵母第七号染色体上的 *GCN5* 基因编码, 含有 439 个氨基酸, 是酵母中重要的乙酰基转移酶之一。其功能区域包括: (1) C 端溴结构域, 与 SAGA 介导的核小体乙酰化有关; (2) Ada2p 作用区域, 结合转录共激活因子 Ada2p, 增强乙酰化酶活性; (3) 乙酰转移酶活性区域。Gcn5p 催化组蛋白 H2B N-末端的赖氨酸残基 K11、K16 以及组蛋白 H3 的 K9、K14、K18、K23、K27 位点的乙酰化(图 1)。Gcn5p 作为催化亚基与不同的调控因子结合, 组成 3 个结构功能更为复杂的染色质修饰复合物: SAGA、ADA 和 SLIK/SALSA。因此, Gcn5p 不仅被转录激活因子

招募到特定基因的启动子区调控其转录, 还参与全基因组范围的组蛋白乙酰化^[9]。

2.1.2 Esa1p: 由位于酵母第十五号染色体上的 *ESA1* 基因编码, 含有 445 个氨基酸, 是酵母中乙酰基转移酶 MYST 家族成员。Esa1p 优先乙酰化 H4 组蛋白, 并在一定程度上乙酰化 H2A 和 H3 组蛋白(图 1)。它参与组成了两种大小不同的调控复合物: (1) 核小体组蛋白 H4 乙酰基转移酶复合物 NuA4, 由 13 个亚基组成; (2) 较小的异源三聚体复合物 piccolo NuA4 (picNuA4), 与另两个亚基 Epl1 和 Yng2 共同组成。最新研究表明, 在酿酒酵母中 NuA4 乙酰化位点是特定基因(如

PHO5)的组蛋白 H2A 和 H4, *picNuA4* 则在全基因组范围内催化组蛋白 H4 的乙酰化^[8]。

2.2 去乙酰化酶

根据系统发生学分析和酶催化机制的不同, 可以将酿酒酵母中的去乙酰化酶分为三大类^[10]: 第一、二类去乙酰化酶 Rpd3p、Hda1p 家族, 两家族成员具有一定的序列同源性, 而且催化位点均含有锌离子, 为锌依赖型。其成员有 Rpd3p、Hda1p、Hos1p、Hos2p 和 Hos3p 等。研究表明, 这两类去乙酰化酶无论在调控单个基因还是调控全局转录中都发挥关键作用; 第三类去乙酰化酶 Sirtuin 家族, 其酶催化活性依赖辅酶 NAD⁺, 主要成员包括 Sir2p、Hst1p、Hst2p、Hst3p 和 Hst4p。其中 Sir2p 在酵母接合型位点 *HML* 和 *HMR*、端粒区域以及 rDNA 重复区起作用并诱导转录沉默^[11]。每个家族中的典型代表及作用特点总结如下。

2.2.1 Rpd3p: 由位于酵母第十四号染色体的 *RPD3* 基因编码, 含有 433 个氨基酸, 是酵母中发现最早的去乙酰化酶。该酶催化多种组蛋白赖氨酸基团的去乙酰化(图 1)。在酿酒酵母中 Rpd3p 至少参与形成了两种不同的调控复合体: Rpd3L 和 Rpd3S; 二者有共同核心部分 Rpd3p、Sin3p 和 Ume6p。此外, Rpd3S 还含有 Rco1p 和 Eaf3p 两种蛋白, 而较大的 Rpd3L 复合物则由另外的 11 种蛋白参与组成^[12]。通过共阻遏蛋白的招募作用, Rpd3L 复合物定位于基因的启动子区域从而抑制基因的转录^[13]; Rpd3S 则定位于基因编码区域并且不需要 DNA 结合蛋白的招募, 因此 Rpd3S 被认为可能参与抑制基因组的全局转录^[14]。

2.2.2 Hda1p: 由位于酵母第十四号染色体的 *HDA1* 基因编码, 含有 706 个氨基酸, 是酵母第二类去乙酰化酶。Hda1p 催化组蛋白 H2B 和 H3 的赖氨酸残基去乙酰化(图 1)。虽然 Hda1p 与 Rpd3p 具有一定的序列同源性, 但二者存在于不同的去乙酰化酶复合物中。这两种蛋白复合物影响两类

不同而又部分重叠的基因的转录。例如, 敲除 *HDA1* 和 *RPD3* 均能引起组蛋白 H3、H4 的乙酰化水平上升, 但 H4 的 K5、K12 位点的去乙酰化只能通过 Rpd3p 来实现^[15]。Hda1p 复合物是异源四聚体复合物, 由 2 个催化亚基 Hda1p 和 2 个 DNA 结合亚基 Hda2p、Hda3p 组成。研究表明, Hda1p 的 N-末端催化亚基与 Hda2p-Hda3p 的 C-末端 CCD 区域结合使各亚基组成一体^[16]。

2.2.3 Sir2p: 在研究酿酒酵母乙酰化的过程中, 发现 Sirtuin 家族的 4 个基因 *SIR1*、*SIR2*、*SIR3* 和 *SIR4*。Sirtuin 家族作为诱发转录沉默的转录因子被归为第三类去乙酰化酶。在众多 Sirtuin 家族成员中, *SIR2* 基因是唯一从古细菌到人类都高度保守的基因, 该基因位于酵母第四号染色体上, 编码含有 562 个氨基酸的蛋白 Sir2p。Sir2p 可在酿酒酵母接合型位点(*HML* 和 *HMR*)、端粒区域以及 rDNA 重复区引发基因沉默, 而 Sir3p 和 Sir4p 只在前两个区域起作用^[11]。有研究表明^[17], 组蛋白 H3 的赖氨酸基团 K9、K14 和 H4 的 K16 基团是 Sir2p 诱导基因沉默的关键位点(图 1)。敲除 *SIR2* 基因后菌株呈现出多种表型, 除了基因沉默缺陷之外, 菌株还表现出 rDNA 重复区的重组频率增加、减数分裂粗线期细胞周期检查点缺陷、染色质不稳定等表型^[18]。

另外, Sir2p 参与形成了两种复合物, 一种由 Sir2p、Sir3p 和 Sir4p 共同组成, 依赖 NAD⁺行使组蛋白去乙酰化的功能^[19]; 另一种由 Sir2p、Net1p 和 Cdc14p 组成的 RENT 复合体, 定位于核仁中^[20]。Net1p 介导 Sir2p 与 rDNA 重复区的联系^[21], 使 Sir2p 影响 rDNA 区域的染色质结构以及抑制有丝分裂和减数分裂期间 rDNA 区域的重组。

3 酿酒酵母乙酰基转移酶和去乙酰化酶的调控机制研究

20 世纪 60 年代, Allfrey 等首次发现了组蛋白

乙酰化修饰现象与基因的调控有关。随后的几十年中,组蛋白乙酰化和去乙酰化修饰成为表观遗传学的研究热点。越来越多的乙酰化酶被发现,新的作用位点、调控机制以及所影响的细胞途径也逐渐被揭示。从影响单个基因转录到调控整个基因组,乙酰化修饰在基因调控方面的作用逐渐由点向面转变,甚至成为一个复杂的调控网络。在这个调控网络中,各种乙酰基转移酶和去乙酰化酶协同作用,此外反义 RNA、胁迫应答元件、蛋白激活因子等也都参与其中。乙酰化修饰不仅仅调控基因表达,同时还涉及 DNA 复制、细胞周期、压力应答反应等多个细胞生命过程的调控。

3.1 Rpd3S 调控基因转录起始

Rpd3p 是最早发现且被广泛研究的组蛋白去乙酰化酶。在酿酒酵母中 Rpd3p 参与形成了两种不同的调控复合体: Rpd3L 和 Rpd3S。在最近的 15 年中, Rpd3L 的基因转录抑制效应研究已经取得了很大的进展。一般认为, Rpd3L 复合物被与 DNA 结合的转录抑制蛋白招募到特定基因的启动子区域从而抑制基因转录。而 Rpd3S 复合物的作用机理并不清楚。最近有研究显示 Rpd3S 介导去乙酰化存在复杂机制。Li Bing 等^[22-25]发现 Rpd3S 被招募到某些长片段基因的 ORF 区域,阻止其不正确的转录起始。Rpd3S 被招募至核小体与组蛋白甲基化紧密相关。其中,甲基转移酶 Set2p 及组蛋白 H3-K36 位点至关重要。体外实验证明 Set2p 甲基化的组蛋白 H3 赖氨酸 K36 基团与组成 Rpd3S 的亚基 Eaf3p 相互作用。但在体内, Rpd3S 并非由 Set2p 的甲基化作用而招募到 ORFs。Simon Drouin 等^[26]的工作表明,在酿酒酵母体内, Rpd3S 招募到基因的 ORF 区域需要 RNA 聚合酶 II C-末端区域的磷酸化以及转录延伸复合物 DSIF 的调控。同时 Chhabi K. Govind 等^[27]证明 RNA 聚合酶 II 的 CTD 区域磷酸化位点是丝氨酸 Ser5 并通过磷酸激酶 Cdk7/Kin28 来实现。

这表明 Rpd3S 参与形成转录复合物。

3.2 乙酰化修饰调控基因转录延伸

新近的研究表明^[28],乙酰化酶复合体 SAGA 和 NuA4 对基因转录延伸也起到促进作用。与招募到基因启动子区域所依赖的亚基 Eaf1p 和 Tra1p 不同, NuA4 复合物定位于基因编码区域依赖的是其与磷酸化的 RNA 聚合酶 II 的 CTD 区域的结合特性。同时组蛋白甲基化酶 Set1p 和 Set2p 加强了 NuA4 与 RNA 聚合酶 II 的相互作用使其定位于基因编码区。而后 NuA4 复合物的乙酰化酶亚基 Esa1p 乙酰化组蛋白 H4 并有利于 RSC 复合物的结合以及组蛋白的解聚,从而促进转录延伸。在此过程中, SAGA 复合物的乙酰化酶亚基 Gcn5p 协助 Esa1p 共同发挥作用。

3.3 H2A.Z 的乙酰化修饰

在酿酒酵母中,除了组成核小体的 4 种常规组蛋白之外,还有多种组蛋白变体。有研究表明^[29],组蛋白变体在染色质特殊位点的嵌合影响基因表达和基因组的完整性。H2A.Z 是最受人们关注的组蛋白变体,其结构和功能逐渐为人们所知。含有 H2A.Z 的核小体定位于特定基因的启动子区域,并形成一种特殊的染色质结构使其在转录激活时有利于自身的解聚。H2A.Z 嵌合到核小体中需要染色质重塑复合物 SWR1 并依赖 ATP,以 Htz1-H2B 二聚体的形式替换出 H2A-H2B。Mohammed Altaf 等^[30]发现 NuA4 乙酰化的染色质区域可以强烈地促进 SWR1 复合物完成由 H2A-H2B 到 Htz1-H2B 的取代。这一过程中, SWR1 复合物的 Bdf1p 亚基与乙酰化的组蛋白赖氨酸残基的结合特性发挥关键作用。Monika Mehta 等^[31]的工作显示, Esa1p 和 Hda1p 分别负责 H2A.Z 自身的乙酰化和去乙酰化。虽然 H2A.Z 调控细胞生命过程的机理仍不清楚,但其在染色质中的分配及乙酰化修饰确实影响了异染色质蔓延、基因转录、染色质稳定等过程^[32-34]。

3.4 乙酰化修饰诱导胁迫应答反应

在不同的环境压力胁迫条件下, Rpd3p 组蛋白去乙酰化复合物作为酿酒酵母中最为主要的去乙酰化酶之一, 参与了酵母的多种应答机制。研究表明, Rpd3p 去乙酰化酶能够在热激、渗透压力和 H_2O_2 处理条件下分别调控各胁迫诱导基因的表达^[35]。Clàudia Ruiz-Roig 等^[36]通过高通量遗传筛选发现 Rpd3p 复合物在酿酒酵母的热激胁迫的应答机制中起着关键作用。热激条件下, Rpd3L 复合物被特异地招募到 Msn2/4 转录因子调控的热激诱导基因的启动子区域, 并且这种招募作用对下一步 RNA 聚合酶 II 指导基因转录来说是必要的。虽然 Rpd3p 复合物激活压力诱导基因更详细的调控机理目前仍不清楚, 但也为乙酰化修饰在酵母压力诱导反应中的贡献提供了有力证据。

Hda1p 与 Rpd3p 有序列相似性, 但二者在功能方面有许多不同之处。Daniel Robyr 等^[37]研究发现在酿酒酵母中, Hda1p 与 Rpd3p 均能够影响全基因组的乙酰化水平。而在染色体距端粒区 10–25 kb 的亚端粒区, 只有 Hda1p 发挥作用。这些亚端粒区命名为 HAST 区域(Hda1-affected subtelomeric regions)。HAST 区域包含有很多环境压力应答反应基因, 如涉及厌氧生长的 *DAN1*、*DAN4*, 渗透压诱导基因 *GRE2*, 铁饥饿应答基因 *FET4*、*FIT2*、*FIT3* 以及磷运输基因 *PHO89* 等。另外, 有研究表明 *PHO89* 基因的抑制与反义 RNA 招募的去乙酰化酶 Hda1p 有关^[38]。

酿酒酵母转录因子 Bromodomain factor 1 (Bdf1p)在蛋白质结构上包含 2 个“溴”结构域(Bromodomain, BRD)。该区域可以结合乙酰化的组蛋白, 激活基因转录。*BDF1* 并非酿酒酵母生存所必需的基础基因, 但其缺失能够引起细胞性状的变化, 如盐胁迫敏感、温度敏感、生长缓慢以及无法在非发酵型培养基上生长^[39]。本实验室在对 *BDF1* 基因缺失与盐胁迫敏感之间关系的研究

中, 通过基因组文库规模化筛选及芯片分析^[40], 证实去乙酰化酶基因 *HDA1* 能回补 *bdf1* Δ 菌株的盐敏感表型。这一结果暗示去乙酰化酶 Hda1p 可能通过 Bdf1p 转录因子参与酵母压力胁迫应答反应, 进一步的分子机制仍在研究中。

另外, *BDF2* 是 *BDF1* 的同源基因, 也被认为是其功能冗余基因。但本实验室研究表明低 *SIR2/BDF2* 比例(mRNA 水平)的菌株大大提高了 *bdf1* Δ 菌株的盐抗性, 其盐抗性比野生型菌株还高, 随着 *SIR2/BDF2* 比例(mRNA 水平)的提高, 菌株的盐抗性也降低。此外, 芯片结果显示, 最低 *SIR2/BDF2* 比例(mRNA 水平)的菌株经 NaCl 处理后, 涉及乙酰化的部分基因的表达发生了明显变化, 这也暗示了乙酰化水平的改变在酵母盐胁迫应答过程中是发挥一定作用的。

3.5 乙酰化修饰与 DNA 复制和 DNA 损伤修复

酿酒酵母的 DNA 复制均从自主复制序列 ARS (Autonomously replicating sequence)处起始, 通过 ARS 的核心保守元件 ACS (ARS consensus sequence)结合 6 个蛋白亚基组成的起始识别复合物 ORC (Origin recognition complex)。在 G1 期的早期, CDC6p 和 6 个 MCM2-MCM7 蛋白参与到 ORC 中形成复制前复合物(Pre-replicative complex, Pre-RC); 在 S 期, 这些复合物被蛋白激酶激活, 完成 DNA 复制的起始过程。组蛋白的乙酰化在 DNA 复制过程中起到重要的调控作用。酿酒酵母中最主要的乙酰基转移酶 Gcn5p 是 DNA 复制起始的正调控因子, 研究表明过表达 *GCN5* 能够抑制各种复制起始因子突变后的表型; 而缺失 *GCN5*, 导致复制起始区染色质凝缩, 同时影响复制前复合物(Pre-RC)的装配^[41]。另外, Knott 等^[42]证明 Rpd3L 影响复制起始的时间和效率, 和去乙酰化酶 Sir2p 一样为 DNA 复制的负调节因子。

组蛋白乙酰化酶和去乙酰化酶通过乙酰化修

饰 DNA 修复和 DNA 损伤检查过程中的关键蛋白来影响 DNA 损伤反应。组蛋白去乙酰化酶抑制剂 VPA 抑制第一、二类去乙酰化酶的活性。经过 VPA 处理后的酵母细胞呈现出多种效应: DNA 损伤检查点反应的激活受到了影响; 双链 DNA 断裂处的切除效率降低; 参与 DNA 修复的重组蛋白 Sae2p 被乙酰化并引起自我吞噬。同样, 在 *Hda1* Δ *rpd3* Δ 菌株中也有类似的现象。但是, 缺失 GCN5 后能够减弱上述现象^[43]。这说明去乙酰化酶 Hda1p、Rpd3p 和乙酰基转移酶 Gcn5p 在 DNA 损伤及修复反应中起重要的调控作用, 共同调节细胞内乙酰化水平从而维持基因组的稳定性。

3.6 乙酰化修饰与染色质沉默

染色质沉默(Chromatin silencing)是指通过形成特殊的染色质结构而失去(或暂时失去)转录活性的 DNA 区域。这些特殊的染色质结构在维持染色体稳定和基因调控中起重要作用。染色质沉默与组蛋白去乙酰化密切相关, 而组蛋白去乙酰化酶 Sir2p 直接参与酵母细胞交配型位点(*HML* 和 *HMR*)、端粒区域以及 rDNA 重复区的染色质沉默。但染色质沉默并不只需要 Sir2p, 还有其他蛋白参与其中。Astrid S. Clarke 等^[44]发现敲除 *SIR2* 基因的菌株在 rDNA 重复区诱导基因沉默时有缺陷, 而提高乙酰基转移酶 *ESA1* 基因的表达量能够弥补这一缺陷。这似乎显示了功能相反的 Esa1p 和 Sir2p 对诱导 rDNA 重复区的基因沉默都有贡献。

Sir2p 诱导染色质沉默发生异常则会影响细胞的生命活动, 因此细胞中需要有相应的调节机制来控制染色质沉默区域的形成。研究表明, 在端粒区乙酰化酶 Sas2p 与 Sir2p 竞争结合组蛋白 H4K16 位点, 形成常染色质区与异染色质的边界。Stefan Ehrentauf 等^[45]发现在乙酰化酶 Sas2p 缺失的情况下, 敲除 *RPD3* 基因会引起异染色质

的蔓延导致细胞死亡。而将 Rpd3p 定位于基因沉默区域则能阻止 Sir2p 依赖的染色质沉默蔓延, 推测可能是因为 Rpd3p 优先结合了 Sir2p 的底物。最近的研究显示, Sir2p 与细胞的寿命相关, 影响细胞复制分裂的次数。Zhenhua Guo 等^[46]发现在寿命长的酵母细胞中, *SIR2*、*HSP30* 和 *TIM17* 基因与寿命短的酵母相比表达量显著上调, 这 3 个基因分别涉及基因沉默、压力应答和线粒体的功能。

3.7 与其他组蛋白修饰形式相互作用

组蛋白除了乙酰化修饰还存在甲基化、磷酸化等多种修饰方式。虽然酿酒酵母的组蛋白修饰位点众多, 但不同组蛋白修饰偶尔也会选择同一修饰位点。组蛋白 H3 赖氨酸 K4 位点便是其中之一。一直以来, 甲基化修饰被认为是 H3-K4 位点的主导修饰形式, 并与激活基因启动子有关。Benoit Guillemette 等^[47]发现 H3-K4 位点同样能被 Gcn5p 和 Rtt109p 乙酰化修饰, 而 Hst1p 和 Sir2p 分别负责其在常染色质和异染色质区域的去乙酰化。全基因组范围的染色质免疫共沉淀(CHIP)显示, 乙酰化的 H3-K4 富集在被激活基因的启动子区域, 并且在同一启动子区域, H3-K4 的甲基化修饰也被发现。他们认为 H3-K4 的甲基化对于其乙酰化形式的定位与富集至关重要。两种不同形式的组蛋白修饰出现于同一位点, 相互作用共同激活基因转录, 为组蛋白修饰机制的研究提供了新的证据。

3.8 非组蛋白形式的乙酰化修饰

新近的研究表明, 乙酰基转移酶的作用底物并非只有核内的组蛋白, 存在于胞质中的某些酶类也是其催化底物, 作用位点同样是赖氨酸残基。Yu-yi Lin 等^[48]通过规模化蛋白芯片筛选得到了乙酰基转移酶复合物 NuA4 的多种非组蛋白底物。其中, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 Pck1p 便是其中之一。Esa1p 和 Sir2p 分别催化其第 514 位赖

氨酸残基(Lys514)的乙酰化和去乙酰化。而另一种乙酰化酶 Gcn5p 在转录和翻译水平均影响 Pck1p 的表达。研究表明, 乙酰化对于 Pck1p 酶活力至关重要, 乙酰化水平不足或去乙酰化使该酶活力减弱甚至失活, 进而影响酵母糖异生途径以及由水饥饿环境引起的细胞寿命的延长。这表明乙酰基转移酶和去乙酰化酶不仅通过影响染色质组蛋白的乙酰化水平进行细胞整体调控, 而且还能以代谢通路中的关键酶为底物, 进行代谢水平的调控。

4 展望

表观遗传学是近年来备受关注的研究领域, 染色质乙酰化修饰及调控机理是其中极为重要的研究内容之一。酿酒酵母的乙酰化修饰涉及了多种酶类、蛋白及细胞因子, 通过不同的机制调控细胞生命活动的众多途径和反应。酵母乙酰化修饰调控作用是错综复杂的, 同时还与其他组蛋白修饰相联系, 调控过程中的各个因素相互作用, 共同构成一个复杂、精细、微妙的调控网络。因此, 要阐明乙酰化修饰的作用机理就需要着眼于一个新的角度即调控网络, 而不再是单个的调控因子。另一方面, 酿酒酵母作为单细胞真核生物, 为研究者提供了合适的研究平台: 有关压力诱导方面的机制可以为植物的抗逆性研究提供参考和借鉴; 而 Sirtuin 家族诱导染色质沉默及细胞寿命相关的研究也为寻找影响人类寿命的疾病和癌症的治疗方法指明了新的方向。挑战与机遇并存, 酵母乙酰化修饰仍需要大量具有指导意义的研究工作。届时, 人们将对酿酒酵母的乙酰化调控机制有更深入的认识, 从而更好地阐释生命的意义和价值。

参考文献

[1] de Ruijter AJM, van Gennip AH, Caron HN, et al.

Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family[J]. *Biochemical Journal*, 2003, 370(Pt 3): 737-749.

- [2] On T, Xiong XJ, Pu SY, et al. The evolutionary landscape of the chromatin modification machinery reveals lineage specific gains, expansions, and losses[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2010, 78(9): 2075-2089.
- [3] Wang QJ, Zhang YK, Yang C, et al. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux[J]. *Science*, 2010, 327(5968): 1004-1007.
- [4] Millar CB, Grunstein M. Genome-wide patterns of histone modifications in yeast[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7(9): 657-666.
- [5] Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, et al. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA[J]. *Cell*, 1993, 72(1): 73-84.
- [6] Garcia-Ramirez M, Rocchini C, Ausio J. Modulation of chromatin folding by histone acetylation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(30): 17923-17928.
- [7] Wolffe AP, Pruss D. Targeting chromatin disruption: transcription regulators that acetylate histones[J]. *Cell*, 1996, 84(6): 817-819.
- [8] Arnold KM, Lee S, Denu JM. Processing mechanism and substrate selectivity of the core NuA4 histone acetyltransferase complex[J]. *Biochemistry*, 2011, 50(5): 727-737.
- [9] Verdone L, Agricola E, Caserta M, et al. Histone acetylation in gene regulation[J]. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 2006, 5(3): 209-221.
- [10] Yang XJ, Seto E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, 9(3): 206-218.
- [11] Blander G, Guarente L. The Sir2 family of protein deacetylases[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2004, 73: 417-435.
- [12] Keogh MC, Kurdastani SK, Morris SA, et al. Cotranscriptional Set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex[J]. *Cell*, 2005, 123(4): 593-605.

- [13] Davie JK, Edmondson DG, Coco CB, et al. Tup1-Ssn6 interacts with multiple class I histone deacetylases *in vivo* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(50): 50158–50162.
- [14] Carrozza MJ, Li B, Florens L, et al. Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription[J]. *Cell*, 2005, 123(4): 581–592.
- [15] Rundlett SE, Carmen AA, Kobayashi R, et al. HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1996, 93(25): 14503–14508.
- [16] Lee JH, Maskos K, Huber R. Structural and functional studies of the yeast class II hda1 histone deacetylase complex[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 391(4): 744–757.
- [17] Imai SI, Armstrong CM, Kaeberlein M, et al. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase[J]. *Nature*, 2000, 403(6771): 795–800.
- [18] Dutnall RN, Pillus L. Deciphering NAD-dependent deacetylases[J]. *Cell*, 2001, 105(2): 161–164.
- [19] Moazed D, Kistler A, Axelrod A, et al. Silent information regulator protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: a SIR2/SIR4 complex and evidence for a regulatory domain in SIR4 that inhibits its interaction with SIR3[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(6): 2186–2191.
- [20] Gotta M, Strahl-Bolsinger S, Renauld H, et al. Localization of Sir2p: the nucleolus as a compartment for silent information regulators[J]. *The EMBO Journal*, 1997, 16(11): 3243–3255.
- [21] Huang JL, Moazed D. Association of the RENT complex with nontranscribed and coding regions of rDNA and a regional requirement for the replication fork block protein Fob1 in rDNA silencing[J]. *Genes and Development*, 2003, 17(17): 2162–2176.
- [22] Li B, Gogol M, Carey M, et al. Infrequently transcribed long genes depend on the Set2/Rpd3S pathway for accurate transcription[J]. *Genes and Development*, 2007, 21(11): 1422–1430.
- [23] Joshi AA, Struhl K. Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation[J]. *Molecular Cell*, 2005, 20(6): 971–978.
- [24] Lickwar CR, Rao B, Shabalin AA, et al. The Set2/Rpd3S pathway suppresses cryptic transcription without regard to gene length or transcription frequency[J]. *PLoS One*, 2009, 4(3): e4886.
- [25] Lee JS, Shilatifard A. A site to remember: H3K36 methylation a mark for histone deacetylation[J]. *Mutation Research*, 2007, 618(1/2): 130–134.
- [26] Drouin S, Laramée L, Jacques PÉ, et al. DSIF and RNA polymerase II CTD phosphorylation coordinate the recruitment of Rpd3S to actively transcribed genes[J]. *PLoS Genetics*, 2010, 6(10): e1001173.
- [27] Govind CK, Qiu HF, Ginsburg DS, et al. Phosphorylated Pol II CTD recruits multiple HDACs, including Rpd3C(S), for methylation-dependent deacetylation of ORF nucleosomes[J]. *Molecular Cell*, 2010, 39(2): 234–246.
- [28] Ginsburg DS, Govind CK, Hinnebusch AG. NuA4 lysine acetyltransferase Esa1 is targeted to coding regions and stimulates transcription elongation with Gcn5[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2009, 29(24): 6473–6487.
- [29] Kamakaka RT, Biggins S. Histone variants: deviants?[J]. *Genes and Development*, 2005, 19(3): 295–310.
- [30] Altaf M, Auger A, Monnet-Saksouk J, et al. NuA4-dependent acetylation of nucleosomal histones H4 and H2A directly stimulates incorporation of H2A.Z by the SWR1 complex[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(21): 15966–15977.
- [31] Mehta M, Braberg H, Wang SY, et al. Individual lysine acetylations on the N terminus of *Saccharomyces cerevisiae* H2A.Z are highly but not differentially regulated[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(51): 39855–39865.
- [32] Babiarz JE, Halley JE, Rine J. Telomeric heterochromatin boundaries require NuA4-dependent acetylation of histone variant H2A.Z in

- Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genes and Development, 2006, 20(6): 700–710.
- [33] Millar CB, Xu F, Zhang KL, et al. Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast[J]. Genes and Development, 2006, 20(6): 711–722.
- [34] Keogh MC, Mennella TA, Sawa C, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A variant Htz1 is acetylated by NuA4[J]. Genes and Development, 2006, 20(6): 660–665.
- [35] Alejandro-Osorio AL, Huebert DJ, Porcaro DT, et al. The histone deacetylase Rpd3p is required for transient changes in genomic expression in response to stress[J]. Genome Biology, 2009, 10(5): R57.
- [36] Ruiz-Roig C, Viéitez C, Posas F, et al. The Rpd3L HDAC complex is essential for the heat stress response in yeast[J]. Molecular Microbiology, 2010, 76(4): 1049–1062.
- [37] Robyr D, Suka Y, Xenarios I, et al. Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases[J]. Cell, 2002, 109(4): 437–446.
- [38] Camblong J, Iglesias N, Fickentscher C, et al. Antisense RNA stabilization induces transcriptional gene silencing via histone deacetylation in *S. cerevisiae*[J]. Cell, 2007, 131(4): 706–717.
- [39] de Jesus Ferreira MC, Bao XM, Laizé V, et al. Transposon mutagenesis reveals novel loci affecting tolerance to salt stress and growth at low temperature[J]. Current Genetics, 2001, 40(1): 27–39.
- [40] Liu XY, Zhang XH, Wang C, et al. Genetic and comparative transcriptome analysis of bromodomain factor 1 in the salt stress response of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Current Microbiology, 2007, 54(4): 325–330.
- [41] Espinosa MC, Rehman MA, Chisamore-Robert P, et al. GCN5 is a positive regulator of origins of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8964.
- [42] Knott SRV, Viggiani CJ, Tavaré S, et al. Genome-wide replication profiles indicate an expansive role for Rpd3L in regulating replication initiation timing or efficiency, and reveal genomic loci of Rpd3 function in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genes and Development, 2009, 23(9): 1077–1090.
- [43] Robert, T Vanoli F, Chiolo I, et al. HDACs link the DNA damage response, processing of double-strand breaks and autophagy[J]. Nature, 2011, 471(7336): 74–79.
- [44] Clarke AS, Samal E, Pillus L. Distinct roles for the essential MYST family HAT Esa1p in transcriptional silencing[J]. Molecular Biology of the Cell, 2006, 17(4): 1744–1757.
- [45] Ehrentraut S, Webera JM, Dybowski JN, et al. Rpd3-dependent boundary formation at telomeres by removal of Sir2 substrate[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(12): 5522–5527.
- [46] Guo ZH, Adomas AB, Jackson ED, et al. SIR2 and other genes are abundantly expressed in long-lived natural segregants for replicative aging of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Yeast Research, 2011, 11(4): 345–355.
- [47] Guillemette B, Drogaris P, Lin HHS, et al. H₃ lysine 4 is acetylated at active gene promoters and is regulated by H3 lysine 4 methylation[J]. PLoS Genetics, 2011, 7(3): e1001354.
- [48] Lin YY, Lu JY, Zhang JM, et al. Protein acetylation microarray reveals that NuA4 controls key metabolic target regulating gluconeogenesis[J]. Cell, 2009, 136(6): 1073–1084.