

# 酿酒酵母中钙信号途径对 $crz1$ 调控基因表达的影响

卢艺婷 王婧雅 赵运英\* 邓禹\*

(江南大学生物工程学院, 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 无锡 214122)

**摘要** 该文通过对酿酒酵母细胞中120个钙离子敏感性基因的启动子进行序列分析发现, 24个基因的启动子上含有转录因子Crz1的结合位点(GNG GC[T/G] CA或GNG GCT G)。该研究检测了钙信号途径对24个基因表达和细胞定位的影响。实验结果表明, 钙信号途径通过转录因子Crz1诱导19个基因的特异性表达及其编码蛋白的细胞定位。结果发现, 5个基因的功能与代谢相关( $TPS1$ 、 $PHO86$ 、 $ERG3$ 、 $ARG82$ 和 $AKR1$ )、5个基因的功能与离子稳态相关( $CSG2$ 、 $PMCI$ 、 $VMA10$ 、 $MNR2$ 和 $VAM2$ )、4个基因的功能与蛋白质分选相关( $PEP3$ 、 $VPS36$ 、 $VPS27$ 和 $VPS4$ )以及5个基因的功能与转录相关( $DEP1$ 、 $IMP2'$ 、 $THP1$ 、 $SGF29$ 和 $ROX3$ )。该文的研究结果为研究酿酒酵母细胞中钙离子稳态调控机制提供了理论基础。

**关键词** 酿酒酵母; 钙信号途径; Crz1; 基因表达; 细胞定位

## The Effect of Calcium Signaling Pathway on the Expression of Genes Regulated by $crz1$ in *Saccharomyces cerevisiae*

Lu Yiting, Wang Jingya, Zhao Yunying\*, Deng Yu\*

(School of Biotechnology, the National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract** The binding site of the transcription factor Crz1 (GNG GC[T/G] CA or GNG GCT G) could be found in the promoter regions of 24 genes by analyzing the promoter sequence of 120 calcium-sensitivity genes in *Saccharomyces cerevisiae*. In this study, the effects of calcium signal pathway on the expression levels and subcellular localizations of these 24 genes have been examined. The results indicated that the specific expressions of 19 genes and the subcellular localizations of the proteins encoded by these genes could be induced by calcium signaling pathway through the transcription factor Crz1. We found that the functions of five genes were involved in metabolism ( $TPS1$ ,  $PHO86$ ,  $ERG3$ ,  $ARG82$  and  $AKR1$ ), five genes were involved ion homeostasis ( $CSG2$ ,  $PMCI$ ,  $VMA10$ ,  $MNR2$  and  $VAM2$ ), four genes were functionally related to protein sorting ( $PEP3$ ,  $VPS36$ ,  $VPS27$  and  $VPS4$ ) and five genes were functionally related to transcription ( $DEP1$ ,  $IMP2'$ ,  $THP1$ ,  $SGF29$  and  $ROX3$ ). The results of this study have provided theoretical basis for studying the regulation mechanism of calcium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*.

**Keywords** *Saccharomyces cerevisiae*; calcium signaling pathway; Crz1; gene expression; cellular localization

$Ca^{2+}$ 是所有真核细胞中许多途径的基本调节剂, 它在很多生物过程中发挥作用, 如细胞周期进

程、交配、蛋白质加工、对低渗的应答、维持细胞内的pH值和足够的营养、代谢信号等<sup>[1]</sup>。酵母细

收稿日期: 2018-02-07

接受日期: 2018-04-19

国家自然科学基金(批准号: 31301021、31500070)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0510-85914371, E-mail: yunyingzhao@jiangnan.edu.cn; dengyu@jiangnan.edu.cn

Received: February 7, 2018

Accepted: April 19, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31301021, 31500070)

\*Corresponding authors. Tel: +86-510-85914371, E-mail: yunyingzhao@jiangnan.edu.cn; dengyu@jiangnan.edu.cn

网络出版时间: 2018-07-30 10:29:56

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180730.1029.002.html>

胞和哺乳动物细胞中Ca<sup>2+</sup>信号途径的相关蛋白非常相似,它们都是通过一系列的综合运输系统严格控制细胞内Ca<sup>2+</sup>平衡<sup>[2]</sup>。在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,细胞外Ca<sup>2+</sup>通过未知转运体“X”和“M”进入细胞质<sup>[3]</sup>。质膜上的钙通道(由Cch1、Mid1和Ecm7组成)允许Ca<sup>2+</sup>流入细胞质,以应答内质网胁迫、信息素低渗胁迫以及低钙条件<sup>[4]</sup>。细胞质中Ca<sup>2+</sup>的瞬时升高激活Ca<sup>2+</sup>/钙调磷酸酯酶(calcineurin, CaN)信号途径,从而激活转录因子Crz1诱导的液泡膜上钙泵基因*PMCI*和内质网/高尔基体膜上钙泵基因*PMRI*的表达,这对细胞应对外界胁迫维持钙稳态是至关重要的。

酿酒酵母通过复杂的钙稳态调控系统使胞质Ca<sup>2+</sup>浓度维持在50~200 nmol/L<sup>[5]</sup>,而内质网/高尔基体腔室Ca<sup>2+</sup>浓度较高(大约10 μmol/L),这个Ca<sup>2+</sup>浓度梯度是通过内质网/高尔基体膜上的钙泵Pmr1实现的,它向内质网/高尔基体内泵送Ca<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup><sup>[6-7]</sup>。此外,定位在内质网上的P-型ATP酶Spf1/Cod1也参与内质网和高尔基体中Ca<sup>2+</sup>稳态的调控<sup>[8]</sup>。清除酵母细胞溶质中过多的Ca<sup>2+</sup>主要是通过液泡膜上的H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交换器Vcx1和钙泵Pmc1将Ca<sup>2+</sup>快速地递送到液泡内<sup>[9]</sup>。Vcx1的活性被CaN以翻译后修饰作用抑制,但其机制尚不清楚<sup>[10]</sup>。我们的研究发现,Pmc1的负调控因子编码基因*NYV1*的表达被Nrg1和Mig1两个转录抑制因子负调控<sup>[11]</sup>。贮存在液泡中的Ca<sup>2+</sup>能够通过Ca<sup>2+</sup>通道Yvc1释放到细胞溶质中<sup>[3]</sup>,胞外高渗透压环境诱导酵母细胞中Yvc1介导的Ca<sup>2+</sup>释放和激发Mid1/Cch1介导的Ca<sup>2+</sup>摄入<sup>[4,12]</sup>。

在酵母细胞中,依赖钙调磷酸酯酶信号传导途径的一个重要功能是通过激活转录因子Crz1(又称Ten1或Hal8)控制基因的表达<sup>[13-14]</sup>。Crz1上的锌指基序能够特异性地结合到目的基因启动子的钙调磷酸酯酶依赖性反应元件(calcineurin-dependent response element, CDRE)上。CDRE是一个对介导Ca<sup>2+</sup>诱导的钙调磷酸酯酶依赖的基因表达所必需的24 bp DNA序列<sup>[15]</sup>。*crz1*突变体对CDRE驱动转录是缺陷的,并表现出与钙调磷酸酯酶突变体相似的表现<sup>[13,15]</sup>,钙调磷酸酯酶突变体的生长缺陷可以通过Crz1的过表达改善。钙调磷酸酯酶主要通过去磷酸化调节Crz1的定位来控制Crz1的活性,在无外界刺激条件下,Crz1分布在细胞质内,随着细胞内Ca<sup>2+</sup>的增长,它在细胞核内以一种钙调磷酸酯酶依赖性的

方式快速积累,这个过程能被钙调磷酸酶的抑制剂FK506或环孢霉素A抑制<sup>[16]</sup>。去磷酸化的Crz1结合到唯一负责运送Crz1入核的核转运蛋白Nmd5上进入细胞核<sup>[17]</sup>。Crz1从细胞核输出也被其自身的磷酸化状态调控,这个过程需要核输出蛋白Msn5的协助。

哺乳动物中酪蛋白激酶1(CK1)的同源物Hrr25可以负调控Crz1的活性及其核定位。过表达Hrr25拮抗Crz1-依赖性转录活性(CDRE-lacZ活性),降低由Ca<sup>2+</sup>诱导引发的Crz1细胞核定位。相反,在缺乏Hrr25时,Ca<sup>2+</sup>和钙调磷酸酯酶对Crz1的激活作用增强<sup>[18]</sup>。Hrr25不能够完全抑制Crz1的活性,说明还有其他的蛋白激酶和Hrr25共同控制Crz1的磷酸化<sup>[18-19]</sup>。Kimberly等<sup>[19]</sup>证明,PKA能够在体内磷酸化Crz1并通过抑制它的入核对其进行负调控,同时发现,PKA在Crz1上的磷酸化位点位于其NLS内或NLS附近。Sopko等<sup>[20]</sup>于2006年通过SDL筛选发现,Crz1是周期蛋白依赖性激酶Pho85的一个底物。Crz1被蛋白激酶Pho85磷酸化,然后被转运到细胞质中,从而失去转录功能。Pho85是酿酒酵母细胞中一个多功能周期依赖性激酶,它在细胞周期调控和磷酸盐代谢途径中有重要的作用。

综上所述,Crz1的调控由蛋白激酶和蛋白磷酸酯酶共同完成。钙调磷酸酯酶通过对Crz1去磷酸化和促进其核定位而对其进行正调控,而Hrr25、PKA和Pho85等3个蛋白激酶通过对Crz1磷酸化抑制其核定位,对其进行负调控。因此,我们通过分析转录因子Crz1的缺失(*crz1/crz1*缺失株)对24个启动子上含有CDRE序列的基因的表达和定位情况来研究钙信号途径对24个基因表达和细胞定位的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和引物 本文所用到的酿酒酵母菌株[野生型BY4743(*MATa/a ura3Δ0/ura3Δ0*、*his3Δ1/his3Δ1*、*leu2Δ0/leu2Δ0*、*lys2Δ0/LYS2*、*MET15/met15Δ0*)、BY4743为背景的*crz1/crz1*酿酒酵母双倍体单基因缺失株和表达GFP融合蛋白的24个酿酒酵母菌株]由本实验室前期构建。本实验所用的菌株和引物分别见表1和表2。

1.1.2 培养基 酵母浸出粉葡萄糖培养基(YPD培养基):2%蛋白胨、2%葡萄糖和1%酵母提取物,定容后0.1 MPa压力下灭菌20 min。配置固体培养

表1 本课题所用菌株  
Table 1 Strains used in this study

菌株 Strain	背景菌 Background	基因型 Relevant genotype	来源 Source
BY4743	S288C	<i>MATa/α ura3Δ0/ura3Δ0;</i> <i>his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0;</i> <i>lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0</i>	Stored by this lab
<i>crz1/crz1</i>	BY4743	<i>crz1::kanMX4/crz1::kanMX4</i>	Stored by this lab
BY4741 Ptk2-GFP	BY4741	BY4741 <i>PTK2-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Vps16-GFP	BY4741	BY4741 <i>VPS16-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Crz1-GFP	BY4741	BY4741 <i>CRZ1-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Vps27-GFP	BY4741	BY4741 <i>VPS27-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Vps36-GFP	BY4741	BY4741 <i>VPS36-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Ppq1-GFP	BY4741	BY4741 <i>PPQ1-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Iba57-GFP	BY4741	BY4741 <i>IBA57-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Tps1-GFP	BY4741	BY4741 <i>TPS1-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Thp1-GFP	BY4741	BY4741 <i>THP1-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Rox1-GFP	BY4741	BY4741 <i>ROX1-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Arg82-GFP	BY4741	BY4741 <i>ARG82-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Imp2'-GFP	BY4741	BY4741 <i>IMP2'-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Sgf29-GFP	BY4741	BY4741 <i>SGF29-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Vps28-GFP	BY4741	BY4741 <i>VPS28-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Snf8-GFP	BY4741	BY4741 <i>SNF8-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Vps20-GFP	BY4741	BY4741 <i>VPS20-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Htz1-GFP	BY4741	BY4741 <i>HTZ1-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Mnr2-GFP	BY4741	BY4741 <i>MNR2-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Pep3-GFP	BY4741	BY4741 <i>PEP3-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Pmc1-GFP	BY4741	BY4741 <i>PMC1-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Vps33-GFP	BY4741	BY4741 <i>VPS33-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Vps4-GFP	BY4741	BY4741 <i>VPS4-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Vma2-GFP	BY4741	BY4741 <i>VMA2-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Sur2-GFP	BY4741	BY4741 <i>SUR2-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Csg2-GFP	BY4741	BY4741 <i>CSG2-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Pho86-GFP	BY4741	BY4741 <i>PHO86-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Cup5-GFP	BY4741	BY4741 <i>CUP5-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Vma10-GFP	BY4741	BY4741 <i>VMA10-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Spf1-GFP	BY4741	BY4741 <i>SPF1-GFP-HIS3</i>	This study
BY4741 Snf7-GFP	BY4741	BY4741 <i>SNF7-GFP-HIS3</i>	This study

基时加入2%(w/v)的琼脂粉。

1.1.3 试剂 10 mg/mL ssDNA购自南京生兴生物技术有限公司; 1 mol/L LiAc溶液购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 50%(w/v) PEG(分子量3 350)购自Sigma公司; 脱脂奶粉购自BD公司; Taq DNA聚合酶购自北京全式金生物技术有限公司; GFP一抗和抗鼠二抗购自北京Invitrogen公司; RNA提取试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司; HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit购自南京诺唯赞生物科技有限公司; CaCl<sub>2</sub>等其他试剂购自国药集团。

1.1.4 实验仪器 实验仪器包括PCR反应仪(德国

艾本德公司)、全温摇瓶柜(太仓强乐实验设备厂)、台式冷冻离心机(日本日立公司)、立式压力蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)、凝胶成像系统和Western blot操作系统(Bio-Rad公司)、荧光显微镜(尼康公司, Nikon 80i)、数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂)。

## 1.2 方法

1.2.1 酵母细胞总蛋白的提取 挑取单菌落至灭菌后的YPD液体培养基, 30 °C、220 r/min震荡培养过夜, 然后按照10%接种量分别转接到2瓶36 mL新鲜YPD液体培养基中, 对照组在30 °C、220 r/min摇

表2 本实验中所用引物  
Table 2 Primers used in this study

引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Sequence (5'→3')
1-DEP1-F	AAG ATG GAT AGC GAC GAG G
1-DEP1-R	TTC CTT CAG CGC AGT CAT C
3-ERG3-F	ACA CCT TTC GCA TCT CAT TC
3-ERG3-R	TTA TCA TCA CCT TCG ACC TCC
7-HTZ1-F	TGG CTT GCA GTT TCC TGT C
7-HTZ1-R	TCT TAC TTC CCT TTT TTT CCA C
10-PPQ1-F	CCT GAC ATC ACC CTC TTA TCG
10-PPQ1-R	TGT AAT TTC TCT TGA CTC ACC CAC
11-THP1-F	TTA TCA TCA ATC TCG CTG GG
11-THP1-R	AAC GAA GGC ATT ATG TAC TTG AG
13-CUP5-F	TTT GGT GCC ATT GGT TGT G
13-CUP5-R	AAC AAA GCA ACA ATC AAA CCG
16-VMA10-F	ATT GCC ACC CTA CTA CAA GC
16-VMA10-R	ACA AGG CAT TGA TAT GGA CTT C
17-SGF29-F	TTC CCT TTG ATG ATG AGC TG
17-SGF29-R	TCA GGT TCA GGA TCT CTC ACT TC
21-MNR2-F	ACC GAT AGG AGA CAA TCG AAC
21-MNR2-R	TCC ATC TTC CTC ATC TTC ATC G
25-VPS36-F	TGA ACC GAA AAC GAG AAG AC
25-VPS36-R	AAT CCC ACT CAG TTG CTT GTC
26-ARG82-F	AGA TGA GCG GTT AAG TGA TTC C
26-ARG82-R	TTC AGT TGA TGC TTT CTC GC
34-VPS4-F	TTG GAA AGT GAA GAG GCA AAC
34-VPS4-R	TCA CCC ATC CAC TTA GAA ACC
46-SUR2-F	TTC CTT TCC ACT AGC ATT TGG
46-SUR2-R	TAA TCC GAG GAA GGT CTG C
57-PHO86-F	AGC TGC ATT GAA TTT GTC CG
57-PHO86-R	ATG CGT ATT GTT CAC CAC TGG
63-PTK2-F	AAC GCC TGT TTA ATT CCA GC
63-PTK2-R	TCT CTA TCC AAA ACT GCT CTA TCC
68-CRZ1-F	ACA ACA GCA ACA GTT ACA ACA GC
68-CRZ1-R	CAA GTC ATC CAA CTC ATC AAG G
69-CSG2-F	TGC CTG CAT CTC GAC TTT G
69-CSG2-R	AGG TAG CCT TCG TGT ATG AGA TG
70-VPS27-F	TGA TGC TTG TAT GAT TTG CTC C
70-VPS27-R	TTC GCT TCT TCA GCT TCT CTC
71-IMP2'-F	ACA GGG AAA GAG GTC GTA GC
71-IMP2'-R	ATG CTG ATC TCG TAC TTG GC
77-VMA2-F	TAC GGT CAG TGG TGT GAA CG
77-VMA2-R	TGT CAA TAG CAG AAA CAC CAG TAG
87-ROX1-F	TAT CGG TGT ATG GCT TGG ATG
87-ROX1-R	TTG TTA CCT GAA TTT GAG CCG
93-PEP3-F	TGT ACC GAG TTG AAT TGA CAG G
93-PEP3-R	AGT CAA CTG GTG TCT CGG TAT AG
102-TPS1-F	TGG GCT AGA GAT TCC TGA CG
102-TPS1-R	AAC CAC CCG ACC TTA ACG
105-PMC1-F	TGG CGA TAA TTC ACT TCC TG
105-PMC1-R	TGA CAT CAC CGA CTA AAA CGT G
ScACT1-F	CTG AAT TAA CAA TGG ATT CTG
ScACT1-R	TTC CAT ATC GTC CCA GTT GG

床中继续培养3~4 h至 $D_{600\text{ nm}}=0.6\sim 0.8$ , 氯化钙处理组培养2 h后加入终浓度为0.2 mol/L  $\text{CaCl}_2$ 继续培养2 h至 $D_{600\text{ nm}}=0.6\sim 0.8$ 。4 °C、8 000 r/min离心1 min, 收集菌体, 用预冷的无菌水洗涤1次, 然后加入200  $\mu\text{L}$  PEB(50 mmol/L pH8.0的Tris-HCl、2 mmol/L EDTA和1 mmol/L PMSF)和与沉淀约等量的酸洗玻璃珠, 震荡30 s, 冰浴1 min, 重复10次。4 °C、12 000 r/min离心10 min, 上清液即为提取的总蛋白, 最后用Bradford法测定蛋白浓度。

**1.2.2 酵母细胞总RNA的提取** 酵母细胞按照1.2.1的培养方法培养后, 4 °C、8 000 r/min的条件离心1 min, 收集菌体, 用1 mL DEPC水离心洗涤1次, 然后加入与细胞等体积的酸洗玻璃珠、400  $\mu\text{L}$ 水饱和酚、400  $\mu\text{L}$ 的TEST, 于振荡器上震荡1 min, 65 °C金属浴5 min, 再震荡30 s, 重复5次后在低温环境中放5 min, 4 °C、12 000 r/min离心15 min, 取上层溶液后加入400  $\mu\text{L}$ 酸酚溶液, 4 °C、12 000 r/min离心15 min后取上清, 加入400  $\mu\text{L}$ 氯仿, 4 °C、12 000 r/min离心15 min后取上清, 加入1 mL预冷的无水乙醇和40  $\mu\text{L}$  3 mol/L的NaAc溶液, 4 °C、12 000 r/min离心10 min, 收集沉淀, 加少量70%乙醇, 离心洗涤1次, 晾干后加入50  $\mu\text{L}$ 的DEPC溶解RNA。琼脂糖凝胶电泳检测RNA并测定RNA的浓度后按照试剂盒HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit进行反转录。

**1.2.3 半定量RT-PCR检测基因的相对表达量** 以野生型钙离子处理前后BY4743和*crz1/crz1*缺失株的cDNA为模板, 分别用内参基因*ACT1*和目的基因的引物进行PCR扩增。分析单个基因的相对表达量时, 以野生型细胞经钙离子处理后的cDNA为模板扩增的DNA量为标准进行比较, 即分别用*crz1/crz1*(YPD)、*crz1/crz1*(YPD+0.2 mol/L  $\text{CaCl}_2$ )、BY4743(YPD)、BY4743(YPD+0.2 mol/L  $\text{CaCl}_2$ )及BY4743(YPD+0.2 mol/L  $\text{CaCl}_2$ +50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CsA)样品的cDNA为模板进行扩增后的DNA量与

BY4743(YPD+0.2 mol/L  $\text{CaCl}_2$ )样品的cDNA为模板进行扩增后的DNA量进行比较, 从而获得目的基因的相对表达量。

**1.2.4 Western blot检测蛋白表达量** 取相同量的酵母细胞总蛋白进行SDS-PAGE电泳检测后转印到PVDF膜上, 加入5%脱脂奶粉室温封闭1~4 h。加入一抗杂交液, 室温2 h或4 °C轻摇过夜。用TBST洗3次, 加入二抗杂交液, 室温轻摇2 h后, 用TBST洗膜3次。将膜与显色底物反应后, 进行曝光显影。

**1.2.5 细胞预处理和荧光显微镜观察** 挑取含有GFP标签的酵母细胞到3 mL YPD液体培养基中, 30 °C、220 r/min震荡培养过夜, 然后第2天按照10%接种量分别转接到2份3 mL新鲜YPD液体培养基中, 对照组在30 °C、220 r/min摇床中继续培养3~4 h至 $D_{600\text{ nm}}=0.6\sim 0.8$ , 氯化钙处理组培养2 h后加入终浓度为0.2 mol/L  $\text{CaCl}_2$ 继续培养2 h至 $D_{600\text{ nm}}=0.6\sim 0.8$ 。取1 mL菌液到EP管中, 3 000 r/min离心1 min, 收集菌体, 分别在荧光显微镜下观察GFP融合蛋白的亚细胞定位情况。

## 2 结果

### 2.1 钙离子敏感基因启动子序列分析

前期工作中, 通过基因组规模的遗传学筛选, 我们鉴定出了120个对钙离子敏感的酿酒酵母基因缺失株。这些基因的功能与细胞代谢、蛋白质分选、离子稳态、转录、细胞内运输、细胞周期和高渗胁迫应答等方面相关。通过分析这些基因的启动子序列我们发现, 24个基因的启动子上含有转录因子Crz1结合位点(GNG GC[T/G] CA或GNG GCT G)(表3), 其中8个基因的功能与代谢相关, 6个基因的功能与离子稳态相关, 4个基因的功能与蛋白质分选相关, 6个基因的功能与转录相关。本文将通过检测这24个基因转录和翻译表达水平研究钙信号途径对这些基因的表达调控作用, 并进一步深入研究钙信

表3 24个基因启动子上含有CDRE序列的钙离子敏感基因的功能分析

功能 Functions	基因 Genes
Metabolism	<i>TPS1, PHO86, PTK2, ERG3, ARG82, SUR2, AKR1</i> and <i>PPQ1</i>
Ion homeostasis	<i>CSG2, PMCI, VMA10, MNR2, CUP5</i> and <i>VMA2</i>
Protein sorting	<i>PEP3, VPS36, VPS27</i> and <i>VPS4</i>
Transcription	<i>DEP1, IMP2, THP1, SGF29, ROX3</i> and <i>HTZI</i>

号途径对这些基因表达蛋白亚细胞定位的影响。

## 2.2 钙信号途径对代谢相关钙离子敏感基因表达的调控作用

**2.2.1 钙信号途径对代谢相关钙离子敏感基因表达水平的影响** 为了检测钙信号途径对代谢相关的8个钙离子敏感基因表达的影响, 我们通过RT-PCR探究了它们在野生型BY4743和*crz1/crz1*缺失株中的mRNA表达水平。首先, 我们提取了野生型BY4743和*crz1/crz1*在钙离子处理前后的总RNA, 然后通过反转录试剂盒将其反转录成cDNA, 利用PCR检测与代谢相关的8个钙离子敏感基因在野生型BY4743和*crz1/crz1*中钙离子处理前后的表达量。我们发现(图1A), 未用钙离子处理的BY4743和*crz1/crz1*缺失株中, *TPS1*、*PHO86*、*ERG3*、*ARG82*和*AKR1*等5个基因表达量相差不大, 钙离子处理后这5个基因在野生型BY4743细胞中的表达量明显高于不加钙离子处理时的表达量, 而*crz1/crz1*中这5个基因表达量没有明显的差异。这说明钙离子通过转录因子Crz1诱导*TPS1*、*PHO86*、*ERG3*、*ARG82*和*AKR1*等5个基因转录水平的表达, 从而实现对这两个基因的正调控作用。而*PTK2*、*PPQ1*和*SUR2*等3个基因在BY4743和*crz1/crz1*中的表达量在钙离子处理前后没有差别, 说明*PTK2*、*PPQ1*和*SUR2*等3个基因的表达不受钙信号途径的影响。

我们通过Western blot实验方法进一步检测了钙离子处理前后代谢相关的8个钙离子敏感基因在

野生型细胞中的蛋白表达情况。首先, 我们按照1.2.1的方法提取了钙离子处理前后分别表达上述8个GFP融合蛋白的野生型细胞的总蛋白, 然后按照1.2.4进行Western blot检测来分析钙离子处理前后8个GFP融合蛋白的表达量。我们发现, 未用钙离子处理的Tps1-GFP、Pho86-GFP、Erg3-GFP、Arg82-GFP和Akr1-GFP融合蛋白的表达量非常低, 而在钙离子处理条件下, 这5个GFP融合蛋白都明显上升(图1B)。这个结果说明, 钙离子能够诱导Tps1-GFP、Pho86-GFP、Erg3-GFP、Arg82-GFP和Akr1-GFP融合蛋白的表达。而Ptk2-GFP、Ppq1-GFP和Sur2-GFP这3个融合蛋白在钙离子处理前后的蛋白表达水平没有明显的差异, 这说明Ptk2-GFP、Ppq1-GFP和Sur2-GFP融合蛋白的表达不受钙信号途径的诱导。

**2.2.2 钙信号途径对代谢相关钙离子敏感基因编码蛋白定位的影响** 为了进一步验证钙信号途径对代谢途径相关的钙离子敏感性基因的调控作用, 我们观察了它们的编码蛋白与GFP形成的融合蛋白的亚细胞定位情况。Tps1-GFP、Pho86-GFP、Erg3-GFP、Arg82-GFP和Akr1-GFP在钙离子处理后的荧光信号都增强, 钙离子处理后Tps1-GFP和Arg82-GFP定位在细胞质, Pho86-GFP和Erg3-GFP定位在内质网上, Akr1-GFP定位在高尔基体上(图1C)。而Sur2-GFP、Ptk2-GFP和Ppq1-GFP三个融合蛋白的荧光定位信号在钙离子处理前后相差不大, 说明它们不受钙信号途径的影响。

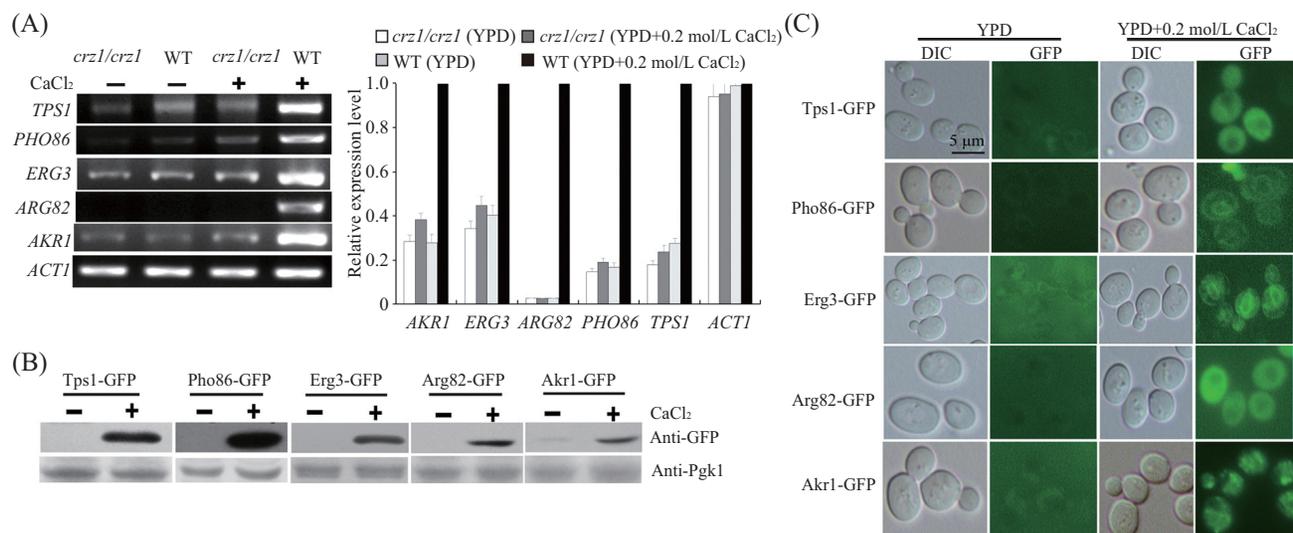


图1 钙信号途径对代谢相关钙离子敏感基因表达和定位的影响  
Fig.1 The effect of calcium signal pathway on the expression and localization of calcium sensitive genes involved in metabolism

### 2.3 钙信号途径对离子稳态相关钙离子敏感基因表达的调控作用

**2.3.1 钙信号途径对离子稳态相关钙离子敏感基因转录水平表达的影响** RT-PCR检测结果显示, 未经钙离子处理时, *CSG2*、*PMCl*、*VMA10*、*MNR2*和*VMA2*等5个基因在BY4743和*crz1/crz1*中的表达量相差不大, 钙离子处理后这5个基因在野生型BY4743细胞中的表达量明显高于不加钙离子处理时的表达量, 而*crz1/crz1*中这5个基因表达量没有明显的差异(图2A)。这个结果说明, 钙离子通过转录因子Crz1诱导*CSG2*、*PMCl*、*VMA10*、*MNR2*和*VMA2*等5个基因转录水平的表达, 从而实现对这五个基因的正调控作用。而钙离子处理前后*CUP5*基因在BY4743和*crz1/crz1*中的表达水平差别不大, 这说明*CUP5*基因的表达不受钙信号途径的影响。

Western blot检测结果也显示, Csg2-GFP、Pmc1-GFP、Vma10-GFP、Mnr2-GFP和Vma2-GFP融合蛋白在钙离子处理后的表达水平都明显升高, 即钙离子能够诱导Csg2-GFP、Pmc1-GFP、Vma10-GFP、Mnr2-GFP和Vma2-GFP融合蛋白的表达(图2B)。Cup5-GFP融合蛋白在钙离子处理前后的蛋白表达水平没有明显的差异, 即它的表达不受钙信号途径的诱导, 这些实验结果与上述6个基因的RT-PCR结果是一致的(图2A)。

**2.3.2 钙信号途径对离子稳态相关的钙离子敏感基因编码蛋白定位的影响** 钙离子处理后, Csg2-GFP、Pmc1-GFP、Vma10-GFP和Vma2-GFP融合蛋

白的荧光信号明显增强; Csg2-GFP融合蛋白定位在内质网上; Pmc1-GFP融合蛋白定位在液泡膜上。Vma10-GFP和Vma2-GFP融合蛋白在未经钙离子处理时定位在液泡膜上; 钙离子处理后, 它们的荧光信号增强并分布在整个液泡中, Mnr2-GFP的荧光信号有所增强, Cup5-GFP的荧光定位信号在钙离子处理前后相差不大, 无法观察其定位情况(图2C)。

### 2.4 钙信号途径对蛋白质分选相关钙离子敏感基因表达的调控作用

**2.4.1 钙信号途径对蛋白质分选相关钙离子敏感基因转录水平表达的影响** 前期序列分析结果发现, 启动子含有Crz1结合位点CDRE序列的4个钙离子敏感性基因*PEP3*、*VPS36*、*VPS27*和*VPS4*都与酵母细胞中的蛋白质分选功能相关。RT-PCR检测结果显示, 钙离子处理后上述4个基因在野生型BY4743细胞中的表达量明显高于不加钙离子处理时的表达量, 而*crz1/crz1*中这4个基因表达量没有明显的差异(图3A)。这说明, 钙离子通过转录因子Crz1诱导*PEP3*、*VPS36*、*VPS27*和*VPS4*等4个基因转录水平的表达, 从而实现对这两个基因的正调控作用。Pep3-GFP、Vps36-GFP、Vps27-GFP和Vps4-GFP融合蛋白在钙离子处理条件下的表达量较未经钙离子处理时都明显上升(图3B), 说明钙离子能够诱导Pep3-GFP、Vps36-GFP、Vps27-GFP和Vps4-GFP融合蛋白的表达, 这与上述8个基因的RT-PCR结果是一致的(图3A)。

**2.4.2 钙信号途径对蛋白质分选相关钙离子敏感基因编码蛋白定位的影响** 荧光显微镜观察结果显

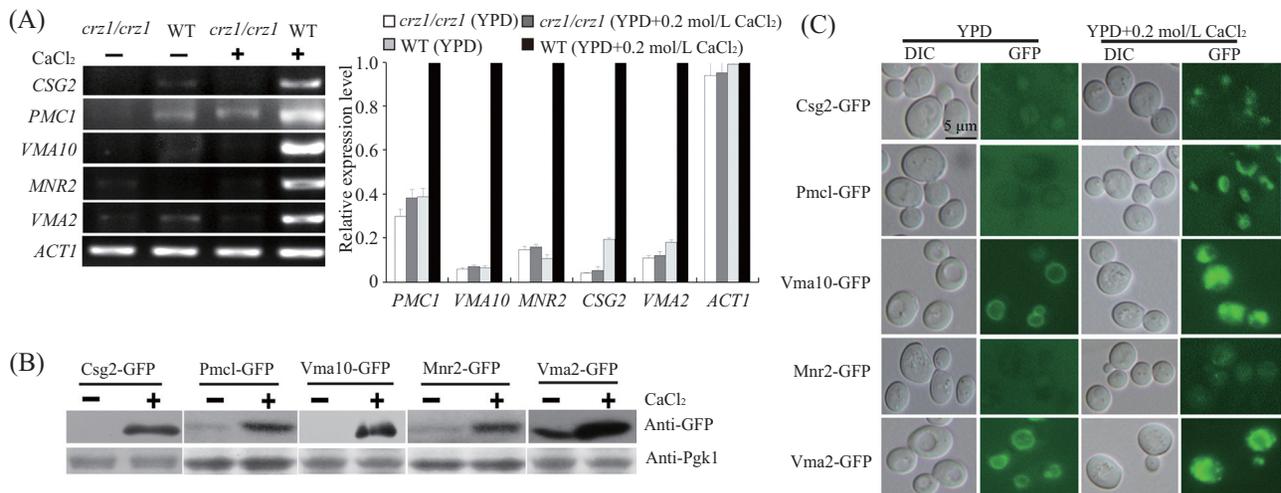


图2 钙信号途径对离子稳态相关钙离子敏感基因表达的影响

Fig.2 Effect of calcium signal pathway on the expression and localization of calcium sensitive genes involved in ion homeostasis

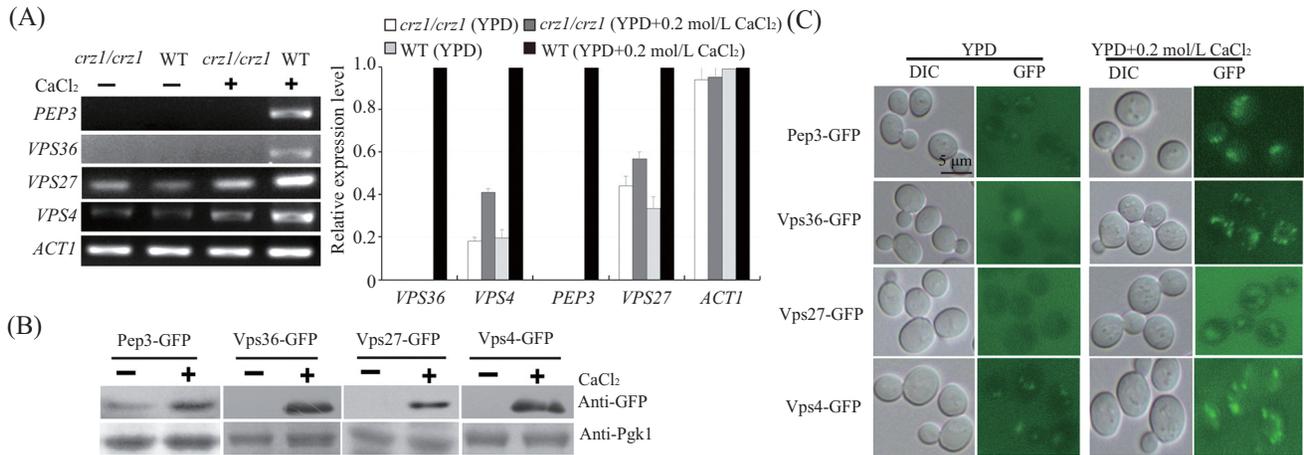


图3 钙信号途径对蛋白质分选相关钙离子敏感基因表达的影响

Fig.3 The effect of calcium signal pathway on the expression and localization of calcium sensitive genes involved in protein sorting

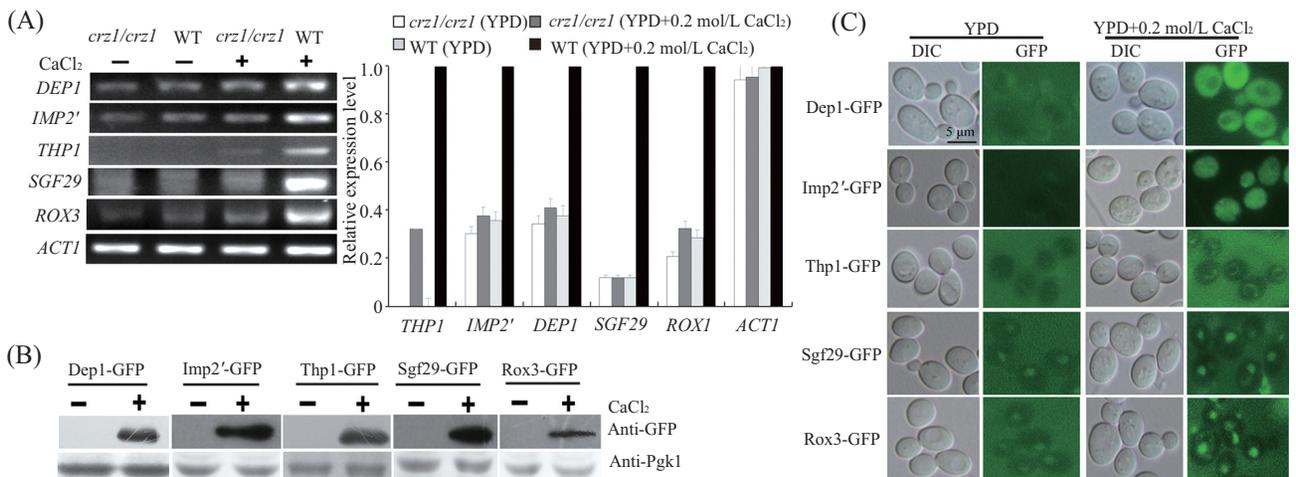


图4 钙信号途径对转录相关钙离子敏感基因表达和定位的影响

Fig.4 The effect of calcium signal pathway on the expression and localization of calcium sensitive genes involved in transcription

示, 钙离子处理后Pep3-GFP、Vps36-GFP、Vps27-GFP和Vps4-GFP融合蛋白的荧光信号都明显增强, 并且都定位在液泡中(图3C)。这说明蛋白分选途径的相关蛋白主要定位在液泡中。

## 2.5 钙信号途径对转录相关钙离子敏感基因表达的调控作用

2.5.1 钙信号途径对转录相关钙离子敏感基因转录水平表达的影响 RT-PCR检测结果显示, *DEP1*、*IMP2'*、*THP1*、*SGF29*和*ROX3*在BY4743细胞中的表达明显受钙离子的诱导, 而*crz1/crz1*中这5个基因表达量没有明显的差异(图4A)。这说明, 钙离子通过转录因子Crz1诱导*DEP1*、*IMP2'*、*THP1*、*SGF29*和*ROX3*等5个基因转录水平的表达, 从而实现对这两个基因的正调控作用。Dep1-GFP、Imp2'-GFP、Thp1-

GFP、Sgf29-GFP和Rox3-GFP融合蛋白在钙离子后的表达水平都明显上升(图4B), 说明钙离子能够诱导上述5个融合蛋白的表达, 这与上述5个基因的RT-PCR结果是一致的(图4A)。而*HTZ1*和Htz1-GFP融合蛋白在钙离子处理前后的表达水平升高不明显。

2.5.2 钙信号途径对转录相关钙离子敏感基因编码蛋白定位的影响 钙离子处理后Dep1-GFP、Imp2'-GFP、Thp1-GFP、Sgf29-GFP和Rox3-GFP融合蛋白的荧光信号明显增强, Dep1-GFP、Imp2'-GFP和Thp1-GFP融合蛋白在钙离子处理前观察不到荧光定位信号, 钙离子处理后Dep1-GFP和Imp2'-GFP位于细胞之中, Thp1-GFP融合蛋白位于细胞核附近, Sgf29-GFP和Rox3-GFP融合蛋白在钙离子处理前可以观察到定位在细胞核中, 钙离子处理后信

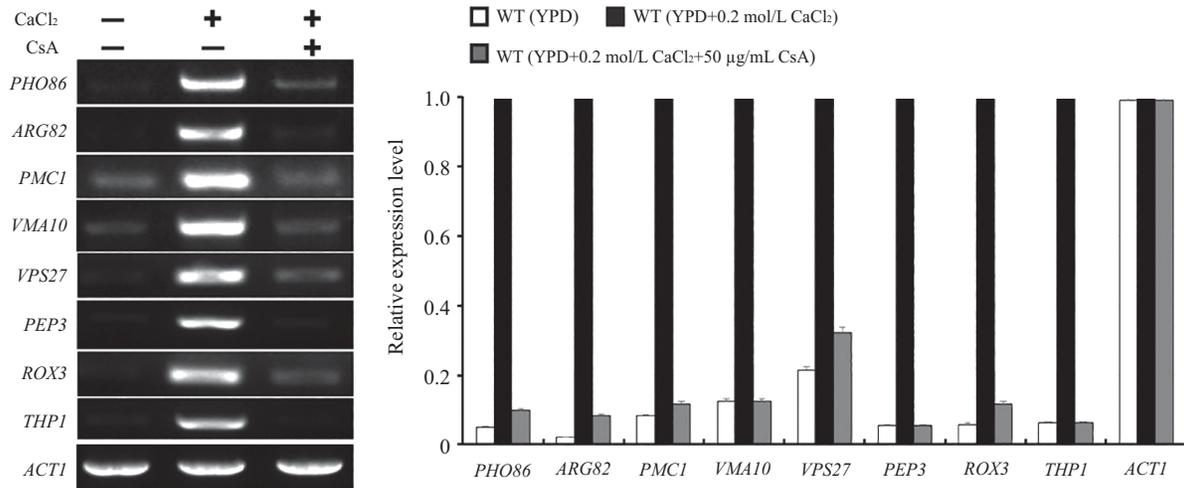


图5 钙调磷酸酯酶抑制剂——环孢霉素A(CsA)对钙诱导基因表达的抑制作用

Fig.5 Suppression of calcium-induced genes by the inhibitor of calcineurin, cyclosporin A (CsA)

号增强也定位在细胞核中(图4C)。Htz1-GFP融合蛋白在钙离子处理前后的荧光信号都比较弱,不能观察到定位在细胞的哪个部位。

### 2.6 钙调磷酸酯酶抑制剂——环孢霉素A(CsA)能够抑制钙信号途径对基因表达的诱导作用

为了验证钙诱导基因表达的特异性,我们用钙调磷酸酯酶的抑制剂——环孢霉素A(cyclosporin A, CsA)抑制钙信号途径<sup>[16]</sup>,然后检测钙诱导基因的表达情况。我们选取了与代谢功能相关的基因*PHO86*和*ARG82*、与离子稳态功能相关的基因*PMCI*和*VMA10*、与蛋白质分选功能相关的基因*VPS27*和*PEP3*以及与转录功能相关的基因*ROX3*和*THP1*等8个基因进行了钙信号途径诱导特异性的检测。实验结果显示,未经钙离子诱导时这8个基因的表达量都非常低,钙离子诱导后他们的表达量明显上升,而当在培养基中同时加入0.2 mol/L CaCl<sub>2</sub>和50 µg/mL CsA时,这8个基因的表达量几乎不受钙离子的诱导,这说明钙离子诱导这些基因的表达具有特异性(图5)。

## 3 讨论

5个受钙信号途径诱导的与代谢相关的钙离子敏感性基因中,*PHO86*、*ERG3*和*AKR1*这三个基因编码的蛋白都定位在内质网上。Pho86在磷酸盐运输过程中具有重要的作用,是高亲和力磷酸盐转运蛋白Pho84所必需的<sup>[21]</sup>,我们推测钙信号途径在磷酸盐运输过程中具有重要作用。*ERG3*编码的蛋白是一个C-5固醇去饱和酶,该基因的缺失阻断固醇类化合物的合成,从而改变细胞膜脂类的成分进而改变细

胞膜对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的向异性,使更多的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>进入细胞导致胞内ROS水平升高<sup>[22]</sup>。*AKR1*编码的蛋白是一个棕榈酰转移酶,它的缺失使Yck1和Yck2不能被棕榈酰化,从而不能正确定位到细胞质膜上,这可能导致细胞内呼吸作用增强而产生过多的活性氧,从而诱导细胞的死亡<sup>[23]</sup>。因此,钙信号途径可能在调控细胞内ROS水平和细胞死亡过程有重要功能。

酵母细胞中,作为Ca<sup>2+</sup>主要储存器的液泡,是类似于动物溶酶体的大容量细胞器<sup>[24]</sup>。与离子稳态相关的钙离子敏感基因*PMCI*、*VMA10*和*VMA2*的基因表达和细胞定位都受到钙信号途径的诱导,并且都定位在液泡中。*Pmc1*是液泡钙离子泵,它的表达和细胞定位受钙信号途径的诱导,这与之前的报道一致<sup>[25]</sup>。*Vma10*和*Vma2*都是液泡H<sup>+</sup>-ATPase的亚基<sup>[26]</sup>,在液泡质子运输过程中具有重要作用。

钙离子通过转录因子Crz1诱导液泡中与蛋白质分选相关钙离子敏感基因*PEP3*、*VPS36*、*VPS27*和*VPS4*的表达和细胞定位。*Pep3*是CORVET复合物的组成成分,参与胞内蛋白的定向运输和蛋白质与膜的融合过程<sup>[27]</sup>。*Vps36*、*Vps27*和*Vps4*属于E类Vps蛋白,它们在膜蛋白运输到溶酶体中的降解过程——MVB途径(the multivesicular body pathway, MVB pathway)中发挥作用。转录相关的6个钙离子敏感基因*DEP1*、*IMP2*、*THP1*、*SGF29*和*ROX3*的表达受钙信号途径的诱导,其中*Sgf29*-GFP和*Rox3*-GFP融合蛋白能够定位在细胞核中。*Sgf29*是SAGA(Spt-Ada-Gcn5)复合物的组成成分<sup>[28]</sup>,*Rox3*是RNA聚合酶II复合体的组成成分<sup>[29]</sup>,它们在基因表

达调控中都具有重要作用。

总之,在真核细胞中,酵母细胞内钙信号传导对许多生物学过程都至关重要,它可以控制信息素产生所需的特定基因组的转录、细胞增殖、心肌收缩等诸多功能<sup>[23]</sup>,细胞通过复杂的调控机制维持细胞内钙平衡。本研究通过对120个Ca<sup>2+</sup>敏感性基因的启动子序列进行分析,发现了24个启动子上含有转录因子Crz1的结合位点的基因,并进一步检测了钙信号途径对这些基因表达及其编码蛋白亚细胞定位的影响。我们发现,其中5个基因的功能与代谢功能相关,5个基因的功能与离子稳态相关,4个基因的功能与蛋白质分选相关,5个基因的功能与转录相关。这些研究结果有助于我们深入了解酵母细胞内的钙稳态调控机制,为进一步研究人体内与钙离子平衡和钙信号途径相关疾病的机理研究提供新的线索。

### 参考文献 (References)

- Rispail N, Soanes DM, Ant C, Czajkowski R, Grunler A, Huguet R, *et al.* Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* 2009; 46(4): 287-98.
- Cyert MS, Philpott CC. Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2013; 193(3): 677-713.
- Rigamonti M, Groppi S, Belotti F, Ambrosini R, Filippi G, Martegani E, *et al.* Hypotonic stress-induced calcium signaling in *Saccharomyces cerevisiae* involves TRP-like transporters on the endoplasmic reticulum membrane. *Cell Calcium* 2015; 57(2): 57-68.
- Martin DC, Kim H, Mackin NA, Maldonado-Baez L, Evangelista CC Jr, Beaudry VG, *et al.* New regulators of a high affinity Ca<sup>2+</sup> influx system revealed through a genome-wide screen in yeast. *J Biol Chem* 2011; 286(12): 10744-54.
- Cui J, Kaandorp JA, Sloot PM, Lloyd CM, Filatov MV. Calcium homeostasis and signaling in yeast cells and cardiac myocytes. *FEMS Yeast Res* 2009; 9(8): 1137-47.
- Curwin AJ, von Blume J, Malhotra V. Cofilin-mediated sorting and export of specific cargo from the Golgi apparatus in yeast. *Mol Biol Cell* 2012; 23(12): 2327-38.
- Sorin A, Rosas G, Rao R. PMR1, a Ca<sup>2+</sup>-ATPase in yeast Golgi, has properties distinct from sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps. *J Biol Chem* 1997; 272(15): 9895-901.
- Palmgren MG, Nissen P. P-type ATPases. *Annu Rev Biophys* 2011; 40: 243-66.
- Cagnac O, Aranda-Sicilia MN, Leterrier M, Rodriguez-Rosales MP, Venema K. Vacuolar cation/H<sup>+</sup> antiporters of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2010; 285(44): 33914-22.
- Cunningham KW, Fink GR. Calcineurin inhibits VCX1-dependent H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange and induces Ca<sup>2+</sup> ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1996; 16(5): 2226-37.
- Zhao Y, Xiong B, Xu H, Jiang L. Expression of *NYV1* encoding the negative regulator of Pmc1 is repressed by two transcriptional repressors, Nrg1 and Mig1. *FEBS Lett* 2014; 588(17): 3195-201.
- Ma Y, Sugiura R, Koike A, Ebina H, Sio SO, Kuno T. Transient receptor potential (TRP) and Cch1-Yam8 channels play key roles in the regulation of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in fission yeast. *PLoS One* 2011; 6(7): e22421.
- Matheos DP, Kingsbury TJ, Ahsan US, Cunningham KW. Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 1997; 11(24): 3445-58.
- Mendizabal I, Rios G, Mulet JM, Serrano R, de Larrinoa IF. Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett* 1998; 425(2): 323-8.
- Stathopoulos AM, Cyert MS. Calcineurin acts through the *CRZ1/TCN1*-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev* 1997; 11(24): 3432-44.
- Stathopoulos-Gerontides A, Guo JJ, Cyert MS. Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Genes Dev* 1999; 13(7): 798-803.
- Polizotto RS, Cyert MS. Calcineurin-dependent nuclear import of the transcription factor Crz1p requires Nmd5p. *J Cell Biol* 2001; 154(5): 951-60.
- Kafadar KA, Zhu H, Snyder M, Cyert MS. Negative regulation of calcineurin signaling by Hrr25p, a yeast homolog of casein kinase I. *Genes Dev* 2003; 17(21): 2698-708.
- Kafadar KA, Cyert MS. Integration of stress responses: modulation of calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase A. *Eukaryot Cell* 2004; 3(5): 1147-53.
- Sopko R, Huang D, Preston N, Chua G, Papp B, Kafadar K, *et al.* Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Mol Cell* 2006; 21(3): 319-30.
- Lau WT, Howson RW, Malkus P, Schekman R, O'Shea EK. Pho86p, an endoplasmic reticulum (ER) resident protein in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for ER exit of the high-affinity phosphate transporter Pho84p. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(3): 1107-12.
- Pedroso N, Matias AC, Cyrne L, Antunes F, Borges C, Malho R, *et al.* Modulation of plasma membrane lipid profile and microdomains by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med* 2009; 46(2): 289-98.
- Reddi AR, Culotta VC. SOD1 integrates signals from oxygen and glucose to repress respiration. *Cell* 2013; 152(1/2): 224-35.
- Denis V, Cyert MS. Internal Ca(2+) release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J Cell Biol* 2002; 156(1): 29-34.
- Stathopoulos-Gerontides A, Guo JJ, Cyert MS. Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Genes Dev* 1999; 13(7): 798-803.
- Forgac M. Structure and properties of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases. *J Biol Chem* 1999; 274(19): 12951-4.
- Xu H, Zick M, Wickner WT, Jun Y. A lipid-anchored SNARE supports membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(42): 17325-30.
- Bian C, Xu C, Ruan J, Lee KK, Burke TL, Tempel W, *et al.* Sgf29 binds histone H3K4me2/3 and is required for SAGA complex recruitment and histone H3 acetylation. *EMBO J* 2011; 30(14): 2829-42.
- Gustafsson CM, Myers LC, Li Y, Redd MJ, Lui M, Erdjument-Bromage H, *et al.* Identification of Rox3 as a component of mediator and RNA polymerase II holoenzyme. *J Biol Chem* 1997; 272(1): 48-50.