

基于酵母产孢的 syntaxin 家族蛋白 SNARE 区域功能分析

王丽萍, 邵侃凯, 高晓冬, 中西秀树*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 真核细胞中大部分膜融合过程由 SNARE 蛋白介导,但其功能和调节机制尚未完全清楚。酵母孢子形成是研究囊泡融合机制包括 SNARE 蛋白的理想模型系统。在该过程中涉及 t-SNARE 蛋白 Sso1,它是突触囊泡融合所需蛋白 syntaxin 1A 的同源物,两者 SNARE 区域有 51%的同源性。尽管如此,将 SSO1 的 SNARE 区域完全替换成 syntaxin 1A,而构建的嵌合体却无法回补 *sso1Δ* 突变的产孢缺陷。为了确定哪些残基为 Sso1 功能所必须,作者进行了嵌合体和突变分析,发现 Sso1/syntaxin 1A 嵌合体中 syntaxin 1A 的 SNARE 区域的 220 位丙氨酸换成谷氨酸后获得产孢功能。另外,Sso1 发生相应的突变-218 位谷氨酸突变成丙氨酸后失去其功能。因此,218 位谷氨酸残基为 Sso1 产孢功能所必须。

关键词: SNARE;人源化;酿酒酵母;Sso1p;syntaxin1A

中图分类号: Q 784 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)05—0530—06

Functional Analysis of the SNARE Domain of Syntaxin Family Proteins Using Yeast Sporulation

WANG Liping, SHAO Kankai, GAO Xiaodong, NAKANISHI Hideki*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In eukaryotic cells, most of membrane fusion processes are mediated by SNARE proteins. However, its functional and regulatory mechanisms have not been fully understood. Previous study have shown that yeast sporulation was an ideal model system to manipulate and investigate vesicle fusion machinery including SNARE proteins. The t-SNARE protein Sso1 involved in this process is an orthologue of syntaxin 1A which is required for the synaptic vesicle fusion, both share 51% homology at the SNARE domains. However, although their functional and amino acid sequence are similar, Sso1/syntaxin 1A chimera cannot complement the sporulation deficiency of *sso1Δ* mutant when SNARE domain of Sso1 is replaced completely by syntaxin 1A. To determine which residues are critical for Sso1 function, chimera and mutational analyses are further conducted. The results

收稿日期: 2014-00-00

基金项目: 国家“111 计划”项目 (111-2-06); 教育部科学研究项目 (313027); 高等学校博士学科点专项科研基金项目 (20120093110001); 江南大学自主科研项目 (JUSRP311A02)。

* 通信作者: 中西秀树(1973—),男,日本人,农学博士,教授,博士研究生导师,主要从事分子生物学、酵母遗传学、细胞生物学和糖生物学方面的研究。E-mail:hideki@jiangnan.edu.cn

showed that the SSO1/syntaxin 1A chimera gain the functionality by replacing Ala220 residue to Glu in the syntaxin 1A SNARE domain. By contrast, Sso1 lose its function by mutating the corresponding amino acid residue, Glu218 into Ala. Thus, Glu218 residue is specifically required for Sso1 function.

Keywords: SNARE, humanization, *Saccharomyces cerevisiae*, Sso1p, syntaxin1A

在真核生物中,囊泡融合机制是高度保守的,SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors; 可溶性 NSF 附着蛋白受体)蛋白是融合蛋白中的重要成员^[1-2]。SNARE 蛋白是保守性很强的蛋白家族,经常被分为两组:Q-SNARE 蛋白和 R-SNARE 蛋白^[3]。SNARE 蛋白位于特定的膜上,只有当同源的 Q-SNARE 蛋白和 R-SNARE 蛋白结合时,泡膜才能融合。

在神经元的突触囊泡融合过程中,syntaxin-1^[4]和 SNAP-25 扮演 Q-SNARE 角色,synaptobrevin 则扮演着 R-SNARE 角色。当囊泡膜上的 synaptobrevin 与 syntaxin-1 和 SNAP-25 结合在一起时,突触囊泡中的神经递质就会释放出来,传递给突触后膜^[1,3,5-7]。SNARE 蛋白不仅和神经递质释放有关,也和粘蛋白及血小板升高引起的人类疾病有关。研究表明,抑制 SNARE 蛋白功能可导致神经退行性疾病^[8-9]。SNARE 融合过程受到 complexin^[10]、Tomosyn^[11-12]、Munc18/nSec-1^[13]等多种蛋白质的调控,但调控机制尚不明确。

酵母细胞中同样存在 SNARE 融合系统,syntaxin-1 在突触囊泡融合过程中的作用机制可利用酵母的 SNARE 融合系统来研究。

酵母中有两个 syntaxin 蛋白——Sso1p 和 Sso2p,他们是哺乳动物 syntaxin1 的同源物且彼此高度相似。Sso1p 和 Sso2p 在酵母营养细胞中共同执行基本功能——与 SNARE 蛋白 Sec9p, Snc1p 和 Snc2p 形成质膜复合体^[14]。在孢子形成过程中则特异性地要求 Sso1p 存在^[15-16]。在该过程中 Spo20p 代替 Sec9p,与 Sso1p, Snc1p 和 Snc2p 形成复合体,促使纺锤体极点上 prospore membrane (PrM) 的扩展。Sso1p 缺失的酵母因 PrM 无法扩展而不能形成孢子。

在 SNAREs 参与的孢子形成过程中,SSO1 和 SPO20 是 PrM 形成所必需的基因^[16]。Hideki Nakanishi 等人已研发出监测 PrM 形成过程中囊泡融合的技术。这类现象也可通过荧光显微镜观察到,并且在

活细胞中可看到 PrM 的延伸^[17-18]。因此,PrM 的形成过程是研究囊泡融合机理的一个理想操作模型系统。SNARE 蛋白基因在进化过程中比较保守,可以将 Sso1p 的 SNARE 区域替换成 syntaxin1 的 SNARE 区域从而构建人源化的膜融合体系。根据改造得到的菌株不仅可用于在酵母细胞中研究人类突触囊泡融合机理,还可用于医疗和工业用途,其中包括建立神经肉毒素的检测系统。而且,它们也是筛选参与突触囊泡融合新基因的非常有用的工具。

作者通过嵌合体的构建对 Sso1p 的 SNARE 区域的产孢功能区进行了定位,并成功构建了 sso1Δsso2Δ 突变株,为筛选与 syntaxin1A 作用的蛋白或药物提供了更为简便的方法。也为后续人源化 SNARE 膜融合系统的构建及相关理论研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌株和质粒 酿酒酵母出发菌株 AN120、HJ3 (*sso1Δspo20Δ*)、质粒 pFA6a-kanMX6、质粒 pFA6a-his3MX6、质粒 pRS314、质粒 pRS304、质粒 pRS316、质粒 pRS426;由作者所在实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 KOD-Plus-Neo 高保真 DNA 聚合酶;东洋纺公司;Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶及 T4-DNA Ligase;TaKaRa 公司;PCR 产物纯化试剂盒、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒及质粒小提试剂盒;上海生工生物公司;其他试剂:均为进口分装或国产分析纯。

1.1.3 培养基

1) YPAD 培养基:每升含酵母膏 10 g,蛋白胨 20 g,葡萄糖 20 g,腺嘌呤 30 mg;

2) YNB 选择培养基:每升含酵母基础氮源 6.7 g,葡萄糖 20 g,补加适量必须元素;

3) YPAce 培养基:每升含酵母膏 10 g,蛋白胨

20 g, 乙酸钾 20 g, 腺嘌呤 30 mg;

4)产孢培养基:每升含乙酸钾 20 g;

5)5-FOA (5-Fluoroorotic Acid)^[19]培养基:每升含酵母基础氮源 6.7 g, 5-氟乳清酸 1 g, 葡萄糖 20 g, 补加适量必须元素;

6)LB-氨苄培养基:每升含酵母膏 5 g, 胰蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 氨苄 100 mg;

7)G418 培养基:每升含酵母膏 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 腺嘌呤 30 mg, G418 500 mg。固体培养基添加 2 g/dL 的琼脂粉。

1.2 基因敲除

基因敲除方法见文献 [20]。其中质粒 pFA6a-kanMX6 为敲除 *SSO1* 的模板, 质粒 pFA6a-his3MX 为敲除 *SSO2* 的模板, PCR 引物见表 1。

表 1 PCR 引物

Table 1 Primers

引物	目的片段	引物序列 (5'-3')
F1	To delete <i>SSO1</i>	GAAAACCCCTTTTACAATTAAAAAAGGCAATTAATAAGAAACAAATCAACGGATCCCCGGGT TAATTAA
R1	To delete <i>SSO1</i>	TTAACGCGTTTGTACAACGCTGGGACAACAACGACAACAACAACGACTAGAATTCGAGCTCGT TTAAAC
F2	To check deletion of <i>SSO1</i>	AAATGAGCTCTAAGACAGTCAACCTCGTGG
R2	To check deletion of <i>SSO1</i>	ATAGCTCGAGTTAACGCGTTTGTACAACGG
F3	To delete <i>SSO2</i>	GTAATACTTTACATTTGAAAACTGCCCATACACGCACAAATATTGCAGCACGGATCCCCGGGT ATTAA
R3	To delete <i>SSO2</i>	AGGTTTTCGGTTTAAATAGAAATTGTTTGATTACACATAATAGGAATTGGGAATTTCGAGCTCGTT AAAC
F4	To check deletion of <i>SSO2</i>	CCCTAAACGACGTGCTTATC
R4	To check deletion of <i>SSO2</i>	TCCCTTTTCCACCCCGATT

1.3 产孢分析

将含质粒的酿酒酵母在 YNB 选择培养基于 30 ℃ 培养过夜, 取 500 μL 培养液转接至 4.5 mL YPAce 培养基中培养 20~24 h, 收集细胞, 无菌水洗后重悬于 3 mL 产孢培养基中继续培养 30 h, 观察记产孢率。每种质粒转化两次, 每次选 3 个单菌落计数, 细胞数不少于 500。

1.4 PrM 的观察

将以 pRS304 为载体构建的质粒单酶切, 回收所得线性质粒转化 *sso1* Δ 缺陷株, 色氨酸缺陷平板筛选阳性克隆。用 pRS426-G20 转化所得菌株, 色氨酸、尿嘧啶缺陷平板筛选阳性克隆, 按产孢分析方法培养, 产孢培养基中培养 6、7、8 h 时各取 500 μL 培养液收集细胞, 水洗后重悬于 50 μL 无菌水, 加 450 μL 甲醛, 30 ℃ 摇床处理 30 min。收集细胞, 无菌水洗两次后重悬于 100 μL 无菌水, 取 5 μL 细胞悬液与 5 μL DAPI 溶液混合, 制片观察 PrM。

1.5 营养细胞生长分析

以 pRS316*SSO1pr-SSO1* 转化 *sso1* Δ 单倍体缺陷株, 以筛选所得阳性克隆为出发菌株敲除 *SSO2*, 得 *sso1* Δ *sso2* Δ 双缺陷型菌株。将待验证质粒转入 *sso1* Δ *sso2* Δ, 在 YNB 选择性平板上筛选出阳性克

隆, 随后划线到 5-FOA 平板上观察生长状况。

2 结果与讨论

2.1 Sso1p 与 syntaxin1A 的嵌合体不能使酵母产孢

Syntaxin 含有具三个短螺旋的 N 端结构域、SNARE 区域及带有极短亲水尾的 C 端跨膜结构域^[3]。膜融合过程中, syntaxin 的 SNARE 区域与其他 SNARE 蛋白结合形成四螺旋束结构, 将两侧膜拉近从而进行随后的融合。Syntaxin 的 SNARE 区域为自身 N 端结构及多种其他调控蛋白的作用部位, 故在本研究中考考虑将 Sso1p 的 SNARE 区域替换成 syntaxin1A 的 SNARE 区域。

以 pRS314 为载体构建含 syntaxin1A (*sytx1A*) 与 Sso1p 的嵌合体 Sso1p/*sytx1A* (SNARE 区域) 的质粒, 转化 *sso1* Δ 后观察其能否产孢。在减数分裂 II 期, 含不同质粒的酵母细胞均能形成四个新的细胞核; 含 Sso1p 的酿酒酵母可形成 PrM, 进而形成孢子, 嵌合体则只在纺锤体处形成点状结构而无法扩张, 说明其缺乏 Sso1p 在孢子形成过程中的功能, 意味着不能将 Sso1p 的 SNARE 区域全部替换成 *sytx1A* 的 SNARE 区域, 见图 1。

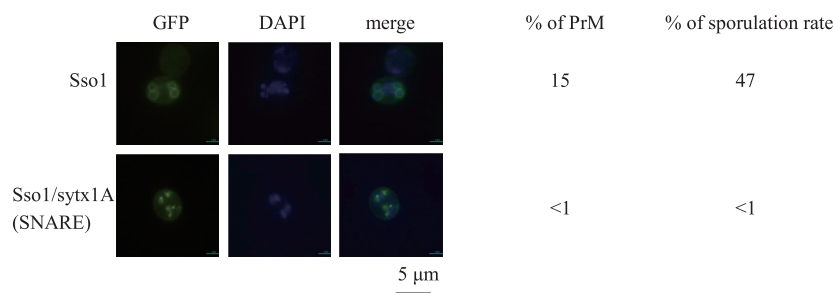


图 1 含重组质粒的 *sso1*△ 在产孢培养基中培养 7 h 后 PrM 形态

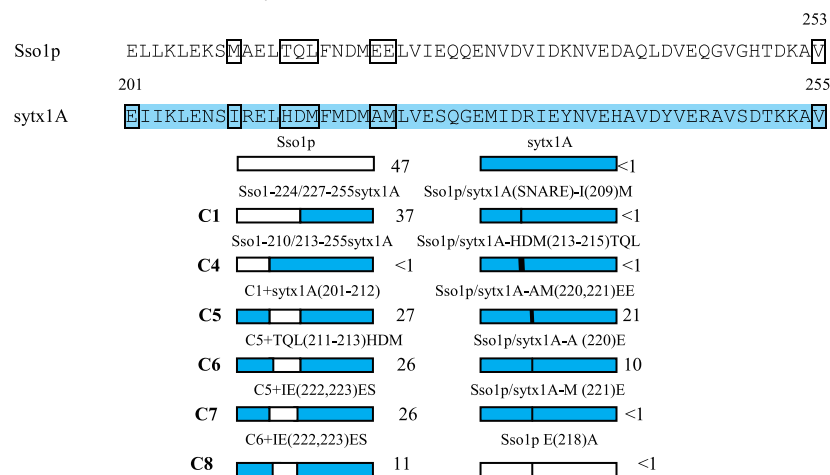
Fig. 1 Shape of PrM of *sso1*△ containing recombinant plasmid which cultured for 7 h in spore medium

2.2 A220 为嵌合体无产孢功能的原因

Syntaxin1A 与 *sso1p* 的 SNARE 区域有 51% 的同源性,将其替换 *sso1p* 的 SNARE 区域后却使其失去产孢功能(本研究中氨基酸编号为其原本在 *Sso1p* 与 syntaxin1A 中的编号),为何如此高的同源性功能却有如此大的差异?故设计了一系列嵌合体对 *Sso1p* 产孢功能区进行定位,见图 2。产孢分析结果表明:保留 *Sso1p* 第 214~221 位氨基酸,其余 SNARE 区域全部替换成 *sytx1A*,嵌合体仍能产孢,意味着 *Sso1p* 的 214~221 位氨基酸为其形成 SNARE 复合体所必须。

根据该结果,我们大胆假设当位于 *sytx1A* 与其

他 SNARE 蛋白 α 螺旋的接触表面上的与 *Sso1p* 有显著性质差异的氨基酸发生突变后,可能使嵌合体具产孢功能。随后在 *Sso1p/sytx1A*(SNARE)基础上设计了三个定点突变:I(209)M,HDM(213~215)TQL,AM(220,221)EE;结果 *sytx1A* 的 SNARE 区域发生 AM(220,221)EE 突变后能使 *sso1*△ 产孢。进一步定点突变 A(220)E、M(221)E,最终发现 *sytx1A* 发生 A(220)E 突变后具产孢功能,说明 A220 是 *Sso1p/sytx1A*(SNARE)无产孢功能的原因。*Sso1p/sytx1A* 嵌合体仅将 A220 这一个氨基酸突变成 E 后便具有产孢活性,该嵌合体可用于与 *sytx1A* 相作用的蛋白质或药物的筛选。



Sso1p 和 *sytx1A* 的 SNARE 区域氨基酸序列为顶端所示。下方为本实验中所用嵌合体,字母 C 表示嵌合体;空白部分表示 *Sso1p*,阴影部分为 *sytx1A*,竖线为点突变。所有示意图均只显示 SNARE 区域。在 *sso1*△ 中的产孢率列在各示意结构的右侧。

图 2 利用 *Sso1p* 与 *sytx1A* 的嵌合体定位 *Sso1p* 产孢功能区

Fig. 2 Mapping of the sporulation-specific functions in *Sso1p* using fusions with *sytx1A*

2.3 Sso1p 功能的实现需要 E218

由于 *Sso1p/sytx1A* 发生点突变 A(220)E 后具产孢功能,A220 为 *Sso1p/sytx1A* 不能产孢的原因,在 *Sso1p* 中进行相应的突变 E(218)A 后则可以验证 *Sso1p* 的产孢功能是否特异性需要 E 的存在。

将 *Sso1p* 的 E218 突变成 A 后观察 PrM 状态并进行产孢分析。结果含野生型 *Sso1p* 的菌株能形成 4 个 PrM,突变体则只能形成点状结构。结果表明,野生型的 *Sso1p* 发生该突变后无法形成 PrM,见图 3。失去产孢功能,进一步证实该位点氨基酸 E 对产

孢功能的重要性。

酿酒酵母中 Sso1p 为产孢所必须, 其在营养细胞中功能与 Sso2p 相同^[21]。在单倍体酵母中敲除 SSO1

和 SSO2 后, 细胞将无法存活。于是构建了 *sso1* Δ *sso2* Δ 双缺陷型单倍体菌株, 可利用营养细胞实验验证嵌合体的功能。

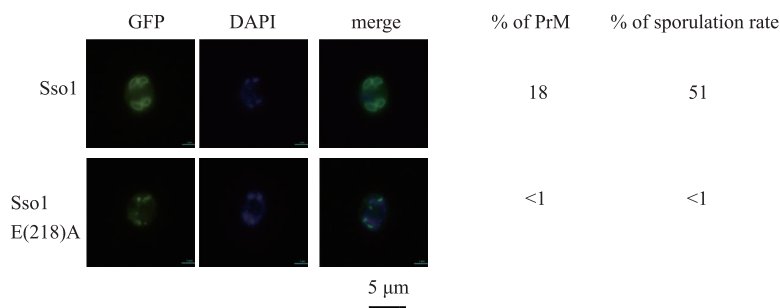
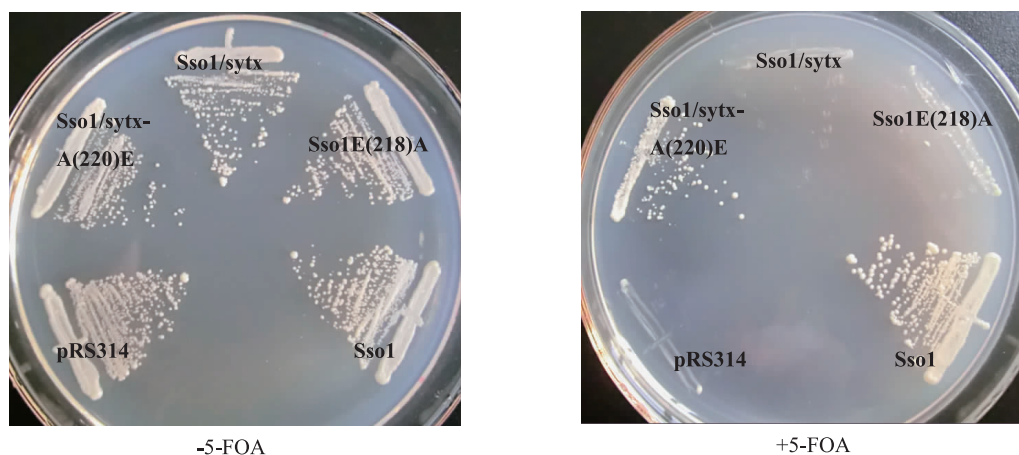


图 3 含重组质粒的 *sso1* Δ 在产孢培养基中培养 7 h 后 PrM 形态

Fig. 3 Shape of PrM of *sso1* Δ containing recombinant plasmid which cultured for 7 h in spore medium

将上述嵌合体转入 *sso1* Δ *sso2* Δ 突变株, 所得转化株转移至含 5-FOA 的平板上使其丢失含野生型 SSO1 的质粒, 嵌合体将成为细胞中惟一的 Sso 蛋白^[19]; 观察转化株生长状况。在不含 5-FOA 的 YNB 选择性(缺乏色氨酸、尿嘧啶)平板上, 各转化株生长状况无明显差别; 转接到含 5-FOA 的 YNB 选择性(缺乏色氨酸)平板上后 Sso1p/sytx1A(SNARE)-A(220)E 能在 5-FOA 平板上生长, Sso1p/sytx1A

(SNARE)、Sso1p E(218)A 则不能生长, 见图 4。当 Sso1p 的 E218 突变成非极性氨基酸 A 后无法进行膜融合, 因而不能存活。与上述结果一致, Sso1p 的 E218 为其形成 SNARE 复合体所必须。利用生长分析所得结果和产孢分析一致, 该系统可用于随后的高通量筛选与 sytx1A 作用的基因或药物, 大大简化筛选工作。



将以 pRS314 为载体构建的嵌合体质粒转入 *sso1* Δ *sso2* Δ 菌株, 转接至 5-FOA 平板除去带野生型 SSO1 的质粒, 使嵌合体成为细胞中惟一的 Sso 蛋白形式。左侧为不含 5-FOA 的选择性平板, 右侧为含 5-FOA 的平板。

图 4 营养细胞实验

Fig. 4 Vegetative cell experiments

3 结 语

作者发现将酵母中 Sso1p 的 SNARE 区域替换成 Sytx1A 的 SNARE 区域而构建的嵌合体 Sso1p/sytx1A 无法使酿酒酵母产生孢子, 将嵌合体的 A220

突变成 E 后则具有产孢活性; 而将 Sso1p 的 E218 突变成 A 后则失去了产孢活性, 因此 E218 为 Sso1p 功能所必须。真核细胞中存在多种与 syntaxin 家族蛋白作用的蛋白质。Complexin 与 Tomosyn 只存在于哺乳动物神经元细胞中, 通过与 syntaxin1A 的

SNARE 区域结合调控神经递质的释放,具体的调控机制尚不明确。实验构建的嵌合体 Sso1p/sytx1A-A (220)E 为利用酵母细胞研究这些蛋白质与 sytx1A 的作用机制提供了新的思路。Munc18/Sec-1 也存在于酿酒酵母细胞中,与 SNARE 复合体结合从而调节膜融合过程。由于 Munc18/Sec-1 与 SNARE 复合体结合时,E218 处于结合位点上,因此该氨基酸发

生突变后可能影响这两种蛋白质的结合。此外,形成 SNARE 核心复合体时,来自于 4 个螺旋的侧链相接触形成 16 个片层,位于片层上的氨基酸直接控制 SNARE 复合物的形成。而 E218 位于片层之外,发生点突变后使 Sso1p 失去活性,因此 E218 有可能调控 SNARE 复合体的形成,为酿酒酵母中膜融合机制的研究提供了参考。

参考文献:

- [1] Hughson F M. Chaperones that SNARE neurotransmitter release[J]. **Science**,2013,339(6118):406-407.
- [2] Shi L,Shen Q-T,Kiel A,et al. SNARE proteins:one to fuse and three to keep the nascent fusion pore open[J]. **Science**,2012,335(6074):1355-1359.
- [3] Chen Y A,Scheller R H. SNARE-mediated membrane fusion[J]. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**,2001,2(2):98-106.
- [4] Zhou P,Pang Z P,Yang X,et al. Syntaxin-1 N-peptide and Habc-domain perform distinct essential functions in synaptic vesicle fusion[J]. **The EMBO Journal**,2013,32(1):159-171.
- [5] Stein A,Weber G,Wahl M C,et al. Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane [J]. **Nature**,2009,460(7254):525-528.
- [6] Südhof T C,Rothman J E. Membrane fusion:grappling with SNARE and SM proteins[J]. **Science**,2009,323(5913):474-477.
- [7] Ungermann C,Langosch D. Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing [J]. **Journal of Cell Science**,2005,118(17):3819-3828.
- [8] Garcia-Reitbock P,Anichtchik O,Bellucci A,et al. SNARE protein redistribution and synaptic failure in a transgenic mouse model of Parkinson's disease[J]. **Brain**,2010,133(7):2032-2044.
- [9] Rendón W O,Martínez-Alonso E,Tomás M,et al. Golgi fragmentation is Rab and SNARE dependent in cellular models of Parkinson's disease[J]. **Histochemistry and Cell Biology**,2013,139(5):671-684.
- [10] Maximov A,Tang J,Yang X,et al. Complexin controls the force transfer from SNARE complexes to membranes in fusion[J]. **Science**,2009,323(5913):516-521.
- [11] Yamamoto Y,Fujikura K,Sakaue M,et al. The tail domain of tomosyn controls membrane fusion through tomosyn displacement by VAMP2[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,2010,399(1):24-30.
- [12] Carr C M,Rizo J. At the junction of SNARE and SM protein function [J]. **Current Opinion in Cell Biology**,2010,22(4):488-495.
- [13] Rathore S S,Bend E G,Yu H,et al. Syntaxin N-terminal peptide motif is an initiation factor for the assembly of the SNARE-Sec1/Munc18 membrane fusion complex [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**,2010,107(52):22399-22406.
- [14] Jantti J,Aalto M K,Oyen M,et al. Characterization of temperature-sensitive mutations in the yeast syntaxin 1 homologues Sso1p and Sso2p, and evidence of a distinct function for Sso1p in sporulation[J]. **Journal of Cell Science**,2002,115(2):409-420.
- [15] Burri L,Lithgow T. A complete set of SNAREs in yeast[J]. **Traffic**,2004,5(1):45-52.
- [16] Neiman A M. Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Genetics**,2011,189(3):737-765.
- [17] Yang H J,Nakanishi H,Liu S,et al. Binding interactions control SNARE specificity in vivo[J]. **The Journal of Cell Biology**,2008,183(6):1089-1100.
- [18] Nakanishi H,Morishita M,Schwartz C L,et al. Phospholipase D and the SNARE Sso1p are necessary for vesicle fusion during sporulation in yeast[J]. **Journal of Cell Science**,2006,119(7):1406-1415.
- [19] Boeke J D,Trueheart J,Natsoulis G,et al. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics[J]. **Methods in Enzymology**,1987,154:164-175.
- [20] Longtine M S,McKenzie III A,Demarini D J,et al. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Yeast**,1998,14(10):953-961.
- [21] Yuan Q,Jantti J. Functional analysis of phosphorylation on *Saccharomyces cerevisiae* syntaxin 1 homologues Sso1p and Sso2p[J]. **PLoS One**,2010,5(10):e13323.