

Dfg5 在酿酒酵母细胞壁合成中的功能分析

田贵花^{1,2}, 王宁^{1,2}, 高晓冬^{1,2}, 藤田盛久^{*1,2}, 喜多岛敏彦^{1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 酿酒酵母中合成的糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白(GPI-APs)一半停留在细胞膜上,另一半被转运至细胞壁的 β -1,6-葡聚糖上形成 GPI 锚定细胞壁蛋白(CWPs)。有分析指出,Dfg5 和 Dcw1 是定位于细胞膜的 GPI 锚定蛋白,可能以同工酶的形式参与 GPI-APs 转运。但这两个同源蛋白的分子作用机制尚不清楚。为探究 Dfg5 的作用机制,本研究构建了 *dfg5 Δ P_{MET3}DCW1* 条件突变菌株。研究发现在 DCW1 表达抑制型突变株中 Cwp1 在细胞膜上大量积累。对 Dfg5 中与甘露糖苷酶催化活性相关保守氨基酸位点分别定点突变,产生的突变蛋白 Dfg5^{W71A}、Dfg5^{D122A}、Dfg5^{D123A} 无法回补条件突变株的生长缺陷。然而截断 Dfg5 前导肽的分泌型 Dfg5 则可回补条件突变株的生长缺陷。上述结果可推测在 GPI-APs 锚定至细胞壁中,Dfg5 至少具有糖苷酶,可将 Cwps 从细胞膜上的 GPI 锚中释放出来。

关键词: Dfg5;糖基磷脂酰肌醇锚定细胞壁蛋白;酿酒酵母;MET3 启动子

中图分类号:Q 786 文章编号:1673-1689(2019)11-0025-08 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.11.004

Characterization of DFG5,Involved in Cell Wall Biogenesis of *Saccharomyces cerevisiae*

TIAN Guihua^{1,2}, WANG Ning^{1,2}, GAO Xiaodong^{1,2}, FUJITA Morihisa^{*1,2}, KITAJIMA Toshihiko^{1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry & Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: *Saccharomyces cerevisiae* possesses cell wall-localized proteins (CWPs), which are essential for the growth. The majority of CWPs are initially synthesized as glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins, followed by transfer of the protein part to the β -glucan. Two GPI-anchored proteins localized at the plasma membrane, Dfg5 and Dcw1, have been proposed to participate in the transfer reaction, however, molecular functions of these homologous proteins are still unclear. In this study, we characterized the Dfg5 using a conditional mutant strain in which DFG5 was disrupted and DCW1 expression was controlled under MET3 promoter. We found that down-regulation of DCW1 expression in the mutant strain caused a great accumulation of our model CWP (Cwp1) in the plasma membrane. Site-directed mutagenesis of

收稿日期: 2017-01-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31400693);江苏省自然科学基金项目(BK20140141);中央高校基本科研业务费(JUSRP51508)。

* 通信作者: 藤田盛久(1979—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事细胞糖生物学方面的研究。E-mail: fujita@jiangnan.edu.cn

引用本文: 田贵花,王宁,高晓冬,等. Dfg5 在酿酒酵母细胞壁合成中的功能分析[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(11):25-32.

Dfg5 revealed that three residues conserved in glycoside hydrolase family 76 were necessary to complement the lethality of the mutant strain. In contrast, the growth defect was complemented by the expression of soluble form of Dfg5, which was secreted in culture medium due to a lack of its pro-peptide sequence. Taken together, these results suggested that at least Dfg5 acts as an enzyme to release CWP from GPI anchor at plasma membrane.

Keyword: Dfg5, GPI-CWPs, *Saccharomyces cerevisiae*, MET3 promoter

酿酒酵母细胞壁由 β -葡聚糖、甘露糖蛋白以及少量几丁质组成^[1]。葡萄糖通过 β -1,3/1,6 糖苷键的方式结合形成葡聚糖构成细胞壁的内层,细胞壁外层则主要由甘露糖蛋白构成^[2-3]。细胞壁外层甘露糖蛋白与细胞壁内层葡聚糖的连接方式主要分为两类:一类甘露糖蛋白通过非共价键与细胞壁内层葡聚糖相连接,可以用 SDS 抽提;另一类甘露糖蛋白通过共价键与细胞壁内层葡聚糖相连,不能用 SDS 抽提,但可以通过 β -1,3-或 β -1,6-葡聚糖苷酶处理释放出来^[4]。根据与葡聚糖相连的羧基端结构和连接键类型,甘露糖蛋白可被分为两类,即糖基磷脂酰肌醇锚定的细胞壁蛋白质(glycosylphosphatidylinositol anchored cell wall proteins, GPI-CWPs)和含有内部氨基酸重复序列的细胞壁蛋白质(CWPs crosslinked by protein with internal repeats, PIR-CWPs)。PIR 型细胞壁蛋白质由内部重复氨基酸序列直接与细胞壁 β -1,3 葡聚糖相连,此类蛋白质可用温和碱(30 mmol/L NaOH, 12 h, 4 °C)提取^[5-6]。GPI-CWPs 型的细胞壁蛋白质则先连接在 β -1,6-葡聚糖上,再通过 β -1,6-葡聚糖与 β -1,3-葡聚糖相连。GPI-CWPs 在许多细胞生长过程中均发挥重要作用,如参与细胞壁的合成、维持细胞形态、参与细胞与外界信号传递、介导细胞之间的黏附^[7]。

酵母中 GPI 锚首先在 ER 中合成并连接到 GPI 前体蛋白质上,随后预装的 GPI 锚定蛋白质(glycosylphosphatidylinositol anchored proteins, GPI-APs)在 ER 和高尔基体中进行包括糖基化修饰在内的进一步改造,经过囊泡运输至细胞质膜外层。当 GPI-APs 到达细胞质膜后,大部分 GPI-APs 会进一步转移到细胞壁^[5]。通常认为 GPI 锚的 N-乙酰葡萄糖胺和第一个甘露糖之间被割开,脂质部分被移除,含有甘露糖残基的 GPI 蛋白质被共价连接至胞外 β -1,6-葡聚糖上,形成 GPI 锚定的细胞壁蛋白

质(GPI-CWPs)^[7-8]。但是目前仍不清楚 GPI 被切割和转移至细胞壁是由一步转糖苷作用完成还是由多个单独的反应完成,也不知道哪种形式的 GPI-Aps 会被转移至细胞壁上。由于 GPI-CWPs 广泛存在于真菌中,其结构和生物合成可作为抗真菌药物的又一靶点。通过阻碍 GPI-CWPs 的生物合成,就可以阻止和破坏真菌的细胞壁合成,也就能达到抑制真菌生长的目的。

Dfg5 和 Dcw1 都属于糖苷水解酶 76 家族(GH76)并且与 α -1,6 甘露糖酶具有同源性,推测可能具有甘露糖酶活性,参与 GPI-Aps 锚定至细胞壁的过程。同时 Dfg5 和 Dcw1 是一对同源 GPI 锚定蛋白, *dcw1Δ* 和 *dfg5Δ* 单突变株均可正常生长,同时敲除 DFG5 和 DCW1 基因的双突变菌株生长致死。当 Dfg5 和 Dcw1 表达都受到抑制时,细胞形态变得又圆又大,几丁质不再以点状形式集中在芽痕,而是均匀遍布整个细胞表面,表明共价连接 GPI-CWPs 到葡聚糖上对细胞生长至关重要^[9-12]。

迄今为止,还不确定 GPI 锚被切割并转运细胞壁是由转糖苷酶催化一步完成还是由多个单独的反应协同完成,以及何种形式的 GPI-Aps 会被转移至细胞壁上。Dcw1 和 Dfg5 作为协助 GPI-Aps 交联至细胞壁的必需蛋白质,其作用机制可能是:1) Dfg5 和 Dcw1 发挥着转糖苷酶的作用,同时承担着 GPI 锚的切割和转移;2) Dfg5 和 Dcw1 是只扮演转糖苷酶的角色参与 GPI 锚的切割,存在其它蛋白质负责 GPI-Aps 转移。由于 Dcw1 和 Dfg5 是同源蛋白质,其功能有重叠。因此作者拟选取 Dfg5 为研究对象在酿酒酵母中对其功能和酶活性特性进行分析,其次拟构建具有活性的分泌型 Dfg5,未来可用于体外研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒构建 酿酒酵母出发菌株 W303-1A,质

粒pRS315、pRS316、YEp352GAP II、YEp352GAP II - sDFG5:均由作者所在实验室保藏和提供。研究中使 用 PCR 引物见表1,质粒见表 2。引物合成和质粒测 序在华大基因完成。

表 1 本研究中使用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物	目的	序列(5'-3')
T1	敲除 DCW1	TTTCTGAGCTTTCTTTCTTTTCAGTCTGTTTAAAAACGAACACATAAAACG GATCCCCGGGTTAATTAA
T2	敲除 DCW1	TTTTTTTCATTTTTCATTTATGGAAATGTTAAGCTTTCATAAGTTCTGCAGA ATTTCGAGCTCGTTTAAAC
T5	敲除 DFG5	TGTTATATAGGACGAACAAATTAGAACGAAATCATATCCAGAACGCAGA TCGGATCCCCGGGTTAATTAA
T6	敲除 DFG5	GCCTAAATATTAGAATACAATAAAATTTTTTGGAGCCTAGTTTGACACAT GAATTCGAGCTCGTTTAAAC
T34	以 MET3 启动子替换 DCW1 启动子	TTTCTGAGCTTTCTTTCTTTTCAGTCTGTTTAAAAACGAACACATAAAAG AATTCGAGCTCGTTTAAAC
T36	以 MET3 启动子替换 DCW1 启动子	CTTGTTCGGAAGAGTACACCCAGTAACCTATCACTTTATTTACTAGCAT CATTTTGAGATCCGGGTTTT
DFG5-Rv	构建 pRS315pDFG5HADFG5	AAAACTGCAGTTAAAACAGCATCCACACAGCC
DFG5-Fw	构建 pRS315pDFG5HADFG5	AAAAAGGATCCATGGATTGGATACTACTAGCAAAACG
71-WA - FW	突变 DFG5 ^{W71A}	AATGCTTCCCCTGCATGCGCCCAATAGTATGCTGACTG
71-WA - RV	突变 DFG5 ^{W71A}	CAGTCACCATACTATTGGGCGCATGCAGGGGAAGCATT
122-D-A-FW	突变 DFG5 ^{D122A}	CCCAAATACCTTGCTCAGCATTCCCCTCAACCATC
122-D-A-RV	突变 DFG5 ^{D122A}	GATGGTTGAGGGGAATGCTGACCAAGGTATTTGGG
123-D-A-FW	突变 DFG5 ^{D123A}	TACCCCAAATACCTTGGGCATCATTCCCCTCAACC
123-D-A-RV	突变 DFG5 ^{D123A}	GGTTGAGGGGAATGATGCCCCAAGGTATTTGGGGTA
256-Y-A-FW	突变 DFG5 ^{Y123A}	CCACCAAGCACCATACCGTGATTAGCAGTCCATTCAATTTTGTAAATATC
256-Y-A-RV	突变 DFG5 ^{Y123A}	GATATTACAAAAATTGAATGGACTGCTAATCACGGTATCGTGCTTGGTGG
T25	构建 pRS316-HF-CWP1	AAAAGAATTCCGAGGATCGCATCACCATCAC
J8	构建 pRS316-HF-CWP1	AAAATCTAGACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCC
NT7	构建 pRS316-HF-CWP1	AAAATCTAGAGATTCCGAAGAATTCCGGCCTGGTG
NT8	构建 pRS316-HF-CWP1	AAAAGCGGCCGCTTCCAGTGCGTTGTAATCCGGTG

注:* 下划线部分为引物所用酶切位点

表 2 本研究中使用的质粒
Table 2 Plasmids used in this study

质粒	基因型	来源
pRS315	Amp ^r , LEU2, 单拷贝, LEU2 标记	作者所在实验室
pRS316	Amp ^r , URA3, 单拷贝, URA3 标记	作者所在实验室
YEp352GAP II	Amp ^r , URA3, 多拷贝, URA3 标记	作者所在实验室
YEp352GAP II -sDFG5	Amp ^r , URA3, 多拷贝, 含截除前导肽的 DFG5 基因	作者所在实验室
pRS316-HF-CWP1	Amp ^r , URA3, 单拷贝, 含 CWP1 基因	本研究
pRS315pDFG5HADFG5	Amp ^r , LEU2, 单拷贝, 含 DFG5 基因	本研究
pRS315pDFG5HADFG5 ^{W71A}	Amp ^r , LEU2, 单拷贝, 含 DFG5W71A 基因	本研究
pRS315pDFG5HADFG5 ^{D122A}	Amp ^r , LEU2, 单拷贝, 含 DFG5D122A 基因	本研究
pRS315pDFG5HADFG5 ^{D123A}	Amp ^r , LEU2, 单拷贝, 含 DFG5D123A 基因	本研究
pRS315pDFG5HADFG5 ^{Y256A}	Amp ^r , LEU2, 单拷贝, 含 DFG5Y256A 基因	本研究

1.1.2 主要试剂和仪器 DNA 连接酶、限制性内切酶: 购于 TaKaRa 公司; PCR 引物、PCR 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒: 购置于上海生物工程公司; β -1,3-glucose: 购置于 Sigma 公司; 相关抗体: 购置于上海生工生物工程公司; SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、Clarity™ Western ECL Substrate 显色剂: 购置于碧云天生物技术研究所。

1.1.3 培养基和溶液配制 YPAD 培养基(1 L): 酵母浸出粉 10 g, 蛋白胨 20 g, 腺嘌呤 30 mg, 加 ddH₂O 至 900 μ L, 121 °C 高压灭菌 15 min, 培养基冷却至 55 °C, 加入 100 mL 单独灭菌的 20 g/dL 葡萄糖。

SD 缺陷型培养基 (1 L): 无氨基酵母氮源 (YNB) 6.7 g, 加水至 900 mL, 121 °C 高压灭菌 15 min, 培养基冷却至 55 °C, 加入 100 mL 单独灭菌的 20 g/dL 的葡萄糖和 2 g 缺少相应氨基酸的氨基酸混合物。

1.1.4 菌株构建 基因敲除的具体方法参见文献[13]。质粒 pFA6a-trp 为敲除 DCW1 和 DFG5 的模板, 质粒 pFA6a-his3MX-PMET3 为构建 dfg5 Δ P_{MET3}DCW1 菌株的模板, PCR 引物见表 1。在酿酒酵母中 MET3 基因编码 ATP 硫酸化酶, 能有效激活无机硫同时并入有机分子中, 是蛋氨酸代谢中的关键步骤。在外源甲硫氨酸作用下, MET3 启动子调控下的目的基因表达受到抑制。在缺少甲硫氨酸的选择性培养基中, MET3 启动子变为增强型启动子, 使其调控下的目的基因高效表达^[14-17]。本研究中使用菌的菌株见表 3。

表 3 本研究中所用的菌株

Table 3 Strains used in this study

菌株	基因型	来源
W303-1A	MATa ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100	作者所在实验室
dcw1 Δ	MATa dcw1 Δ ::TRP1 W303	作者所在实验室
dfg5 Δ	MATa dfg5 Δ ::TRP1 W303	作者所在实验室
dfg5 Δ P _{MET3} DCW1	MATa dfg5 Δ P _{MET3} DCW1 W303	作者所在实验室

1.2 菌株表型验证

将 W303-1A、dfg5 Δ 和 dfg5 Δ P_{MET3}DCW1 在甲硫氨酸缺陷型葡萄糖选择性培养基(SD-Met)中 30 °C 培养过夜, 至 OD₆₀₀=1.0, 取相同细胞数连续做 4 次

10 倍梯度稀释, 在 SD-Met 和含 1 mmol/L 甲硫氨酸的葡萄糖选择性培养基(SD+Met)上点板, 分别在 30、41 °C 培养, 观察细胞生长情况。

1.3 蛋白质提取

1.3.1 细胞膜蛋白质提取 在相应培养中 30 °C 培养过夜, 离心收集 10 mL OD₆₀₀ 的酵母细胞, 用 1 mL 预冷的 2 mmol/L 苯基甲磺酰氟(Phenylmethanesulfonyl fluoride)洗涤 2 次。重悬于 150 μ L 1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液中, 加入 100 μ L 玻璃珠(0.4~0.6 mm), 65 °C 孵育 5 min, 振荡 2 min。再次 65 °C 孵育 5 min, 振荡 2 min。加入 150 μ L 1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液, 65 °C 孵育 5 min。20 000 g 离心 5 min 除去细胞碎片和细胞壁杂质, 收集 100 μ L 上清液, 即可得到膜蛋白^[18-19]。

1.3.2 细胞壁 GPI-CWPI 蛋白质提取 在相应培养基中 30 °C 培养过夜, 离心收集 10 mL OD₆₀₀ 的酵母细胞, 用 1 mL 预冷的 10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5) 洗涤 2 次。重悬于 100 μ L 裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5), 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets)中, 加入适量的玻璃珠。振荡 1 min 后冰浴 1 min, 重复上述振荡及冰浴 5 次。4 °C、100 g 离心 30 s, 分离玻璃珠, 收集细胞裂解液。加入 100 μ L 萃取缓冲液(4% SDS, 100 mmol/L NaCl, 40 mmol/L β -巯基乙醇)后充分混匀, 100 °C 孵育 10 min, 16 000 g 离心 5 min, 去除上清液。再次重悬于 100 μ L 萃取缓冲液中, 100 °C 孵育 2 min, 16 000 g 离心 5 min, 去除上清液, 重复上述循环 3 次。用 1 mL ddH₂O 洗涤 3 次, 16 000 g 离心 5 min 去除上清液^[19]。沉淀所得粗细胞壁碎片重悬于 100 μ L、150 mmol/L 醋酸钠反应液, 加入 2 mg β -1,3-葡聚糖酶, 充分混匀, 37 °C 反应 12 h 以上, 即可得到细胞壁的 GPI-CWPs^[20]。

1.3.3 细胞外蛋白质提取 在相应培养基中 30 °C 培养过夜, 离心收集 10 mL OD₆₀₀ 的酵母细胞培养液, 4 °C、5 000 g 离心 5 min, 去除细胞沉淀并收集上清液。将上清液于 4 °C、15 000 r/min 离心 5 min, 进一步除去细胞碎片。收集的上清液中加入终浓度 10% 的三氯乙酸, 振荡混匀, 冰浴 30 min 以上。离心去除上清液, 沉淀用预冷的丙酮洗涤 3 次后, 溶解于 1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液, 95 °C 孵育 5 min, -20 °C 保存。

1.4 蛋白质免疫印迹电泳

取 100 μ g 蛋白质样品上样跑电泳, 浓缩胶电

压 80 V, 30 min; 分离胶电压 120 V, 90 min; 转膜: 采用半干式转膜方式, 电压 25 V, 电流 1.0 A, 时间 30 min; 封闭: 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h; 孵育抗体: 一抗 1:5 000, 室温 1.5 h 或 4 °C 过夜; 二抗 1:5 000, 室温 1 h; 显色: ECL 显色液 A 和 B 混匀, 涂于膜上, 用 ImageQuant LAS4000mini 显色。

1.5 生长曲线测定

从平板挑取单菌落接种于 5 mL 葡萄糖型甲硫氨酸和尿嘧啶缺陷培养基 (SD-Met-Ura) 中预培养, 离心收集等量对数生长期的细胞, 并将其分别转接至 50 mL SD-Met-Ura 和含 1 mmol/L 甲硫氨酸的葡萄糖型尿嘧啶缺陷 2 培养基 (SD+Met-Ura)。每 12 小时取 1 次样品, 在 OD₆₆₀ 下测定菌浓, 培养至第 72 h 停止测定。以测定的 OD₆₆₀ 数值为纵坐标, 培养时间为横坐标, 得到不同菌株的生长曲线。

2 结果与讨论

2.1 MET3 启动子调控下的突变株表型验证

考虑到 *dcw1Δ* 和 *dfg5Δ* 双突变株存在严重的细胞壁缺陷使其生长致死^[11,17]。为便于研究这两个基因的功能, 作者构建了 *dfg5ΔP_{MET3}DCW1* 条件突变株菌株, 即在 *dfg5Δ* 菌株中用 MET3 启动子调控 DCW1 基因的表达。如图 1 所示, *dfg5Δ* 菌株能在 41 °C 环境中正常生长, 具有耐高温的特性, 与 Nasution^[21] 等研究相符。在甲硫氨酸培养基上 *dfg5ΔP_{MET3}DCW1* 菌株不生长, 表明外源添加甲硫氨酸可诱导 MET3 启动子抑制 DCW1 表达。此时由于 Dfg5 缺失且 Dcw1 表达受抑制, 从而引起细胞壁合成受损, 导致细胞死亡。在缺少甲硫氨酸诱导的情况下, MET3 启动子调控 DCW1 高表达, 此时 *dfg5ΔP_{MET3}DCW1* 菌株表型与 *dfg5Δ* 相似, 无论是在

30 °C 还是 41 °C 条件下, 菌株均可正常生长。上述结果说明, 在酿酒酵母中 Dfg5 和 Dcw1 功能重叠, 单突变株在平板上表型差异小, 双突变株致死。与 Kitagaki^[11] 等研究结果相同。本研究使用的 MET3 启动子可在甲硫氨酸诱导下有效调节 DCW1 表达, 为下一步分析这两个基因的作用机制创造条件。

2.2 Dcw1 和 Dfg5 对细胞壁蛋白质合成的影响

为了研究 Dcw1 和 Dfg5 蛋白质在细胞壁合成途径中的功能, 作者选取 Cwp1 作为一种典型的 GPI 锚定细胞壁蛋白质^[11, 19], 在 W303-1A、*dcw1Δ*、*dfg5Δ*、*dfg5ΔP_{MET3}DCW1* 菌株中分别表达 His-Flag 标记的 Cwp1 蛋白质, 同时用 W303-1A 原始菌株作为空白对照。蛋白质印记结果发现, 在含甲硫氨酸培养基中培养的 *dfg5ΔP_{MET3}DCW1* 双缺陷菌株细胞壁的 Cwp1 蛋白质量明显减少 (图 2(b)), 细胞膜上则可检测到大量 Cwp1 (图 2(a)), 所有菌株的培养基中均检测不到 Cwp1。表明引起细胞壁中 Cwp1 缺失的主要原因是细胞膜上 GPI 蛋白质不能被有效的切割进而无法共价连接到细胞壁上。由此推测 Dcw1 和 Dfg5 在 GPI 型细胞壁蛋白质合成中只扮演糖苷酶的功能, 负责识别和切割细胞膜上的 GPI 蛋白质, 同时酵母中可能存在另一种蛋白质可将切割下来的 GPI 蛋白质连接至细胞壁 β-1, 6-葡聚糖上形成细胞壁蛋白质; 或者 Dcw1 和 Dfg5 扮演糖苷转移酶的功能, 可将切割后 GPI 蛋白质连接至细胞壁上^[10-11]。总之, Dcw1 和 Dfg5 的缺失使 Cwp1 不能成功的从细胞膜的 GPI 锚上释放, 说明这两个蛋白质至少具有类似糖苷酶的作用。单突变菌株细胞膜和细胞壁中 Cwp1 蛋白质量只有少量的变化 (图 2(a), (b)), 可能因为 DCW1 和 DFG5 是同源基因, 其编码的蛋白质是同工酶, 当其中一种蛋白质缺失时, 另一种蛋白质仍可正常工作, 但是 Dcw1 或 Dfg5 单独作用时效率下降, 造成单突变株中细胞膜上积累少量 Cwp1, 细胞壁中 Cwp1 蛋白质含量减少。

2.3 Dfg5 活性位点分析和保守氨基酸突变

普遍认为糖苷水解酶 76 家族 (GH76) 成员具有 α-甘露糖苷酶活性, 但是只有少数蛋白结构和功能被解析清楚。肠寄居多形拟杆菌基因组编码的 BT2849 蛋白质是该家族中惟一被发表的已知结构的蛋白质。尽管 BT2949 与 GH76 家族其他成员氨基酸序列的相似性仅 16%~25%, 但其蛋白质整体结构是相对高度保守的。根据其蛋白质晶体结构

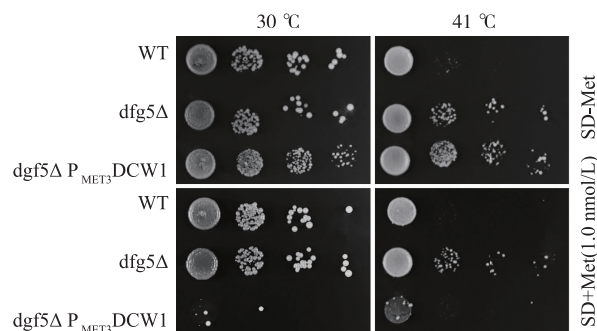


图 1 突变菌株表型

Fig. 1 Phenotype of mutant strains

解析和序列比对发现, 聚集在蛋白质中心位置的 5 个氨基酸位点 W82、D143、E144、D249、Y265 可能是催化活性中心相关位点。目前没有 Dfg5 和 Dcw1 蛋白质结构和活性中心的报道。本研究对包括 Dfg5、Dcw1 和 BT2949 在内的 7 个 GH76 家族成员假定的催化域进行序列比对, 发现 BT2849 中除 D249 外的其它四个氨基酸位点 W82、D143、E144、Y265 在 GH76 家族中高度保守^[12], 由此推测 Dfg5 中对应四个氨基酸位点也可能是潜在的活性中心。

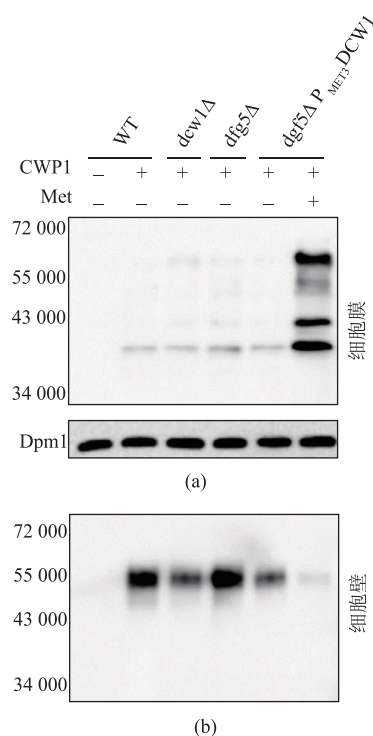


图 2 模式蛋白质 Cwp1 在突变菌株中的表达情况

Fig. 2 Expression of Cwp1 in mutant strains

为了进一步探究酿酒酵母细胞壁合成过程中 Dcw1 和 Dfg5 是否承担着糖苷酶的功能及其活性中心的位置, 本研究选取 Dfg5 蛋白质中对应的四个保守位点 W71A、D122、D123、Y256 进行定点突变, 成功构建突变子 DFG5W71A、DFG5D122A、DFG5D123A、DFG5Y256A。实验结果表明, 在甲硫氨酸培养基中表达野生型 DFG5 和突变 DFG5Y256A 基因的菌株可回补 $dfg5\Delta PMET3DCW1$ 条件突变株菌株的生长缺陷, 而表达突变 DFG5W71A、DFG5D122A、DFG5D123A 基因的菌株不能回补其生长(图 3(a)), 说明突变后的 Dfg5W71A、Dfg5D122A、Dfg5D123A 蛋白质失活。为进一步证明这些突变蛋白质失活是由于蛋白质

降解还是催化活性消失引起的, 作者在 $dfg5\Delta$ 株中表达了含有 HA 标记的野生型 DFG5 基因。蛋白质印迹法分析细胞膜蛋白质和培养液中蛋白质发现, 突变后的 Dfg5W71A、Dfg5D122A、Dfg5D123A 蛋白质大小、表达水平和稳定性均无变化(图 3(b))。说明突变后 Dfg5 没有降解, 突变蛋白质失活极有可能是因蛋白质催化活性中心被破坏。以上结果可推测 W71、D122、D123 这三个氨基酸可能凝聚构成了 Dfg5 的催化活性中心, Dfg5 可能具有甘露糖苷酶的活性。

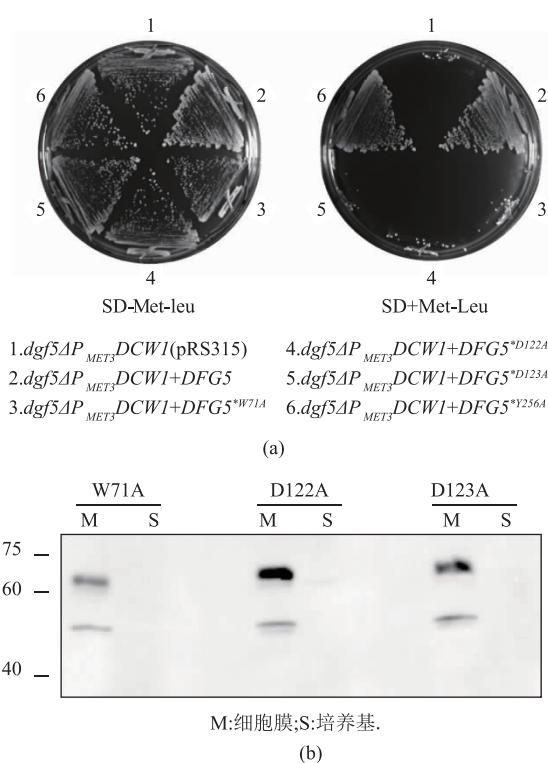


图 3 Dfg5 活性位点分析

Fig. 3 Analysis of the putative catalytic active sites of Dfg5

2.4 过表达可溶性 Dfg5 蛋白质对 $dfg5\Delta PMET3DCW1$ 生长的影响

本研究从野生型菌株基因组中扩增出不含前导肽序列的 DFG5 基因片段($sDFG5$), 用于编码可溶性 Dfg5($sDfg5$)。在野生型和 $dfg5\Delta PMET3DCW1$ 菌株中表达 $sDfg5$ 后, 用 Flag 抗体可在培养基中检测到可溶性 Dfg5, 其中野生型菌株的 $sDfg5$ 分泌量更少(图 4(a))。研究表明, 去除前导肽序列的 DFG5 基因片可段编码不含 GPI 锚的可溶性 Dfg5, 并能成功分泌至培养基中。为了进一步检测 $sDfg5$ 的活性, 研

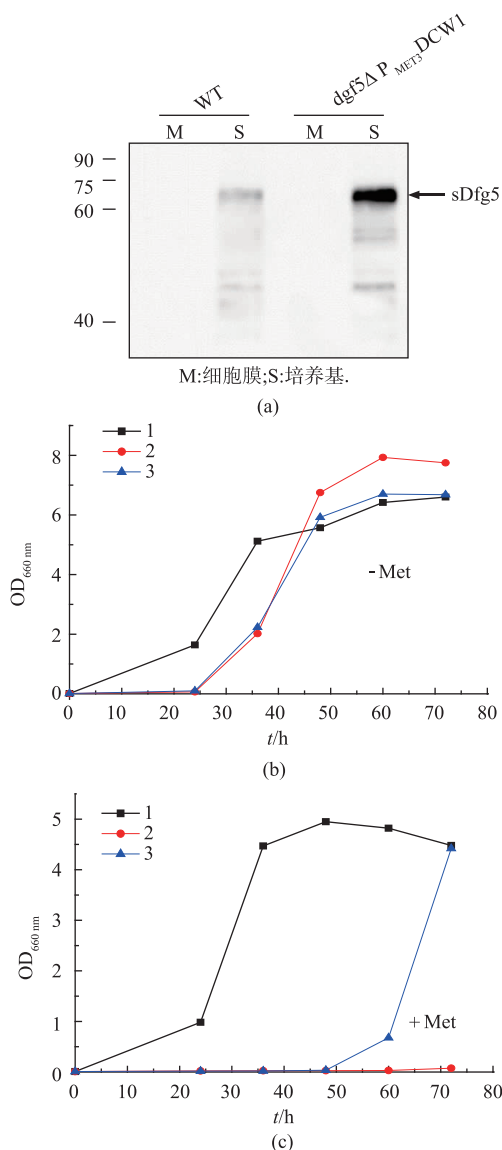


图4 可溶性 Dfg5 在条件突变株中的表达情况

Fig. 4 Expression of Soluble Dfg5 in condition mutant strain

究选取 *dfg5ΔP_{MET3}DCW1* 菌株研究对象,在不同选择性培养基中检测其生长水平。在未加甲硫氨酸的培养基中,*MET3* 启动子诱导下的 *DCW1* 基因可高表达,突变株和野生型都正常生长(图 4(b))。用含有甲硫氨酸的培养基培养时,*MET3* 启动子调控下的 *DCW1* 基因无法正常表达,不表达 sDfg5 的 *dfg5ΔP_{MET3}DCW1* 菌株生长始终受到抑制,但过量表达 sDfg5 的 *dfg5ΔP_{MET3}DCW1* 菌株在培养 40 h 后生长得以回补(图 4(c))。这说明 sDfg5 仍具有活性,GPI 锚的修饰不影响 Dfg5 的功能。

3 结 语

Dcw1 和 Dfg5 是一对同源的 GPI 锚定膜蛋白质,据推测可能有糖苷酶活性,参与真菌细胞壁蛋白质合成,但其分子作用机制尚不清楚,也没有表征酶活的数据。作者通过在 *dfg5ΔP_{MET3}DCW1* 条件突变株中表达模式蛋白质 Cwp1,证实在 GPI-APs 锚定至细胞壁的过程中,Dcw1 和 Dfg5 参与 GPI 的切割。对 Dfg5 中与甘露糖糖苷酶催化活性相关的四个保守氨基酸位点进行突变,其中 W71、D122、D123 这三个位点的单突变蛋白质无法回补致死突变菌株的生长,说明这三个位点对 Dfg5 的活性至关重要,可以推测它可能具有 α -甘露糖苷酶的活性。去除 GPI 锚的可溶性 Dfg5 可成功从细胞膜分泌至培养中。体内研究表明,在液体培养基中可溶性 Dfg5 可回补 *dfg5ΔP_{MET3}DCW1* 条件突变株的生长,说明定位于细胞膜对 Dfg5 活性不重要。从培养基中纯化出来的可溶性 Dfg5 可进一步用于体外研究,作为筛选抗真菌药物的靶蛋白质。

参考文献:

- [1] ORLEAN P. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall[J]. *Genetics*, 2012, 192(3): 775-818.
- [2] KAPTEYN J C, MONTIJIN R C, VINK E, et al. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked β -1,3-/ β -1,6-glucan heteropolymer[J]. *Glycobiology*, 1996, 6(3): 337-45.
- [3] ZHANG Yi, LIU Kun, CAO Peng, et al. A fast, efficient and economical method for isolating plasmid from yeast[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013, 32(11): 1194-1198. (in Chinese)
- [4] LEVIN D E. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway[J]. *Genetics*, 2011, 189(4): 1145-1175.
- [5] KAPTEYN J C, VAN D E H, KLIS F M. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall[J].

- Biochimica et Biophysica Acta**, 1999, 1426(2):373-383.
- [6] 张莉. 毕赤酵母 GPI 型细胞壁蛋白基因的挖掘及功能研究[D]. 广州:华南理工大学, 2014.
- [7] 刑来君, 李明春. 普通真菌学[M]. 北京:高等教育出版社, 1999.
- [8] PITTET M, CONZELMANN A. Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2007, 1771:405-420.
- [9] GONZALEZ M, GODDARD N, HICKS C, et al. A screen for deficiencies in GPI-anchorage of wall glycoproteins in yeast[J]. **Yeast**, 2010, 27(8):583-596.
- [10] KITAGAKI H, ITO K, SHIMOI H. A temperature-sensitive *dcw1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* is cell cycle arrested with small buds which have aberrant cell walls[J]. **Eukaryotic Cell**, 2004, 3(5):1297-1306.
- [11] KITAGAKI H, WU H, SHIMOI H, et al. Two homologous genes, *DCW1* (YKL046c) and *DFG5*, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Molecular Microbiology**, 2002, 46(4):1011-1022.
- [12] THOMPSON A J, CUSKIN F, SPEARS R J, et al. Structure of the GH76 α -mannanase homolog, BT2949, from the gut symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron*[J]. **Acta Crystallographica Section D**, 2015, 71(2):408-415.
- [13] LONGTINE M S, III A M, D J D, et al. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Yeast**, 1998, 14(10):953-961.
- [14] CARE R S, TREVEETHICK J, BINLEY K M, et al. The *MET3* promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics[J]. **Molecular microbiology**, 1999, 34(4):792-798.
- [15] D NKLER A, WENDLAND J. Use of *MET3* promoters for regulated gene expression in *Ashbya gossypii*[J]. **Current genetics**, 2007, 52(1):1-10.
- [16] MAO X, HU Y, CHAO L, et al. *MET3* promoter: a tightly regulated promoter and its application in construction of conditional lethal strain[J]. **Current Microbiology**, 2002, 45(1):37-40.
- [17] ZHANG Zhenzhen, XIA Jinping, MA Ming, et al. Construction and identification of *RAS1* overexpression strain of *Candida albicans*[J]. **Oral Biomedicine**, 2016, 7(2):72-75.
- [18] FRIEMAN M B, CORMACK B P. Multiple sequence signals determine the distribution of glycosylphosphatidylinositol proteins between the plasma membrane and cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Microbiology**, 2004, 150(10):3105-3114.
- [19] VAZQUEZ H M, VIONNET C, ROUBATY C, et al. A Highlights from MBoC Selection: Cdc1 removes the ethanolamine phosphate of the first mannose of GPI anchors and thereby facilitates the integration of GPI proteins into the yeast cell wall[J]. **Mol Biol Cell**, 2014, 25(21):3375-3388.
- [20] KLIPPEL N, CUI S, GROEBE L, et al. Deletion of the *Candida albicans* histidine kinase gene *CHK1* improves recognition by phagocytes through an increased exposure of cell wall β -1,3-glucans[J]. **Microbiology**, 2010, 156(11):3432-3444.
- [21] NASUTION O, LEE J, SRINIVASA K, et al. Loss of *Dfg5* glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane protein confers enhanced heat tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Environmental Microbiology**, 2015, 17(8):2721-2734.