

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (5) :570 - 578; 4 May 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140419

酿酒酵母转运蛋白 Agp1p 泛素化对氮源利用的影响

李应宇, 吕永坤, 周景文, 堵国成, 陈坚*

工业生物技术教育部重点实验室, 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

摘要: 【目的】研究酿酒酵母细胞膜关键氮源转运蛋白 Agp1p 的泛素化对其氮源利用的影响。【方法】构建一个基于双分子荧光互补技术的泛素化检测载体, 检测 Agp1p 是否受到泛素化。采取定点突变的方法对 Agp1p 中可能的泛素化位点进行突变, 研究其泛素化的关键作用位点及其对酿酒酵母氮源利用的影响。【结果】在谷氨酰胺、精氨酸、脯氨酸及铵盐为唯一氮源的培养基中, 转运蛋白 Agp1p 均受到泛素化调控。定点突变实验结果显示, 与出发菌株相比, 潜在泛素化位点突变后, 菌体荧光强度均有一定程度减弱。其中四重突变体 Agp1p^{K11,14,98,112R} 荧光强度最弱, 表明泛素化过程被显著抑制。系列突变菌株在 9 种氨基酸为复合氮源以及尿素为单一氮源的发酵实验表明, 四重突变体菌体氮源利用率提高效果显著。【结论】转运蛋白 Agp1p 的泛素化受到不同氮源的影响, 泛素化位点突变可以显著影响其泛素化过程, 从而改变细胞对氮源的利用过程。

关键词: 酿酒酵母, 泛素化, 透性酶, 双分子荧光互补技术, 转运蛋白 Agp1p

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 05-0570-09

酿酒酵母对氮源的利用受到一系列精确的调控, 以保证细胞可以对外界环境的变化作出合适的调整, 从而维持细胞的正常生长^[1]。当培养基中存在偏好型氮源(如谷氨酰胺、天冬酰胺、铵盐等)时, 会抑制非偏好型氮源(如精氨酸、尿素、脯氨酸)的利用^[2]。当偏好型氮源耗尽后, 细胞才开始利用非偏好型氮源。这种偏好型氮源抑制非偏好型氮源利用的现象称为氮代谢物阻遏(Nitrogen Catabolite Repression, NCR)效应。除了 NCR 效应外, 还有 TOR 途径、SPS 途径、泛素-蛋白酶体降解途径等均能够调控酵母菌对氮源的利用(图 1)。目前, 被报道受 NCR 调控的氮源透性酶有 Gap1p、Agp1p 等十几种之多, 而且不断的有新的氮源透性酶被报道其

表达和 NCR 效应有关^[3]。Gap1p 与 Agp1p 均属于广谱氨基酸透性酶, 具有较低特异性及较强的转运能力, 它们在酿酒酵母氮源转运过程中发挥着重要的作用。转运蛋白 Gap1p 的泛素化过程已经得到广泛的研究^[4], 而转运蛋白 Agp1p 的泛素化修饰及其调控过程还缺乏系统的研究。研究 Agp1p 的泛素化调控机制将为完善酿酒酵母氮源代谢全局调控机制提供可靠的理论依据。

泛素化修饰作为一种重要的翻译后调控方式, 其广泛存在于从酵母到包括人类在内的所有真核生物细胞中。泛素化调控最常见的方式是泛素-蛋白酶体降解途径(Ubiquitin-proteinase degradation pathway)。当酿酒酵母处于高温、高压、营养丰富等外部环境

基金项目: 国家“973 项目”(2012CB720802); 国家自然科学基金重点项目(31130043)

* 通信作者。Tel: +86-510-85918312; Fax: +86-510-85918309; E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

作者简介: 李应宇(1988-), 男, 湖北黄冈人, 硕士研究生。E-mail: liyingyujackey@sina.com

收稿日期: 2014-08-26; 修回日期: 2014-12-15

时,细胞中的氮源透性酶会被一种以泛素化为基础的调控作用降解。参与降解调控作用的主要有泛素-蛋白连接酶(Rsp5p)、泛素降解酶(Doa4p)、泛素化辅助蛋白(Bul1p、Bul2p)、液泡内的蛋白降解酶(Pep4p)以及多种磷酸化酶^[5]。经泛素化的氮源透性酶从细胞膜被转运至液泡中,并被液泡中的Pep4p降解^[6]。这种调控作用对细胞适应外部环境、提高自身生存能力、合理循环利用资源均起到重要作用。本研究采用双分子荧光互补技术检测泛素化,基于双分子荧光互补技术构建了一个泛素化检测载体^[7]。将待研究蛋白的编码序列(去除终止密码子)插入到检测载体的多克隆位点,表达的蛋白末端带有荧光分子的羧基端,表达的泛素分子末端带有荧光分子的氨基端。如果待研究蛋白受到泛素

化调控,则该蛋白与泛素分子的结合将使荧光分子的羧基端、氨基端重新结合成一个完整的荧光分子,因而在荧光显微镜下可以观察到荧光。

通过定点突变的方法来研究转运蛋白 Agp1p 泛素化位点突变对其泛素化过程的调控,以及泛素化调控对于酿酒酵母氮源利用的影响。泛素化位点是转运蛋白与泛素分子结合的位点,对 Agp1p 泛素化过程具有重要的影响。根据泛素化位点预测在线软件 UbPred^[8] 预测 Agp1p 潜在的泛素化位点,该软件预测准确率达到 72%。对于含有特定结构的蛋白,其准确率可高达 85%。通过泛素化位点突变来研究酵母菌对胞外氮源利用的影响,在泛素化调控层面为深入研究酿酒酵母氮源代谢调控提供可靠的理论基础及依据。

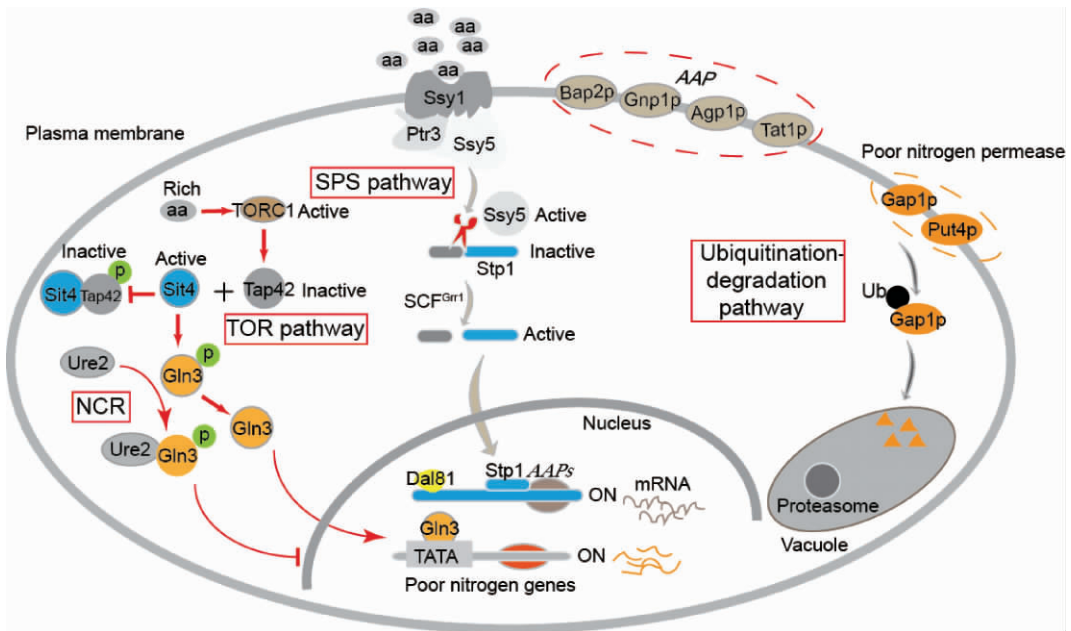


图 1. 酿酒酵母氮代谢调控途径

Figure 1. Nitrogen catabolite pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) CEN. PK2-1D- Δ ubi4 (*MAT α ura3-52*; *trp1-289*; *leu2-3,112*; *his3 Δ 1*; *MAL2-8^C*; *SUC2*)^[7] 和泛素化检测载体 pUbDetec16 为本研究室构建^[9]。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 用于质粒载体构建。

1.1.2 培养基: (1) LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, 调节 pH 至 7.0。固体培养基为相应的液体培养基中加入 20 g/L 琼脂粉。(2) YPD 培养基: 20 g/L 葡萄糖, 20 g/L 蛋白胨, 10 g/L 酵母粉。(3) YNB 液体培养基: 1.74 g/L YNB (Yeast Nitrogen Base without Amino Acids and Ammonium Sulfate), 20 g/L 葡萄糖, 5 g/L 硫酸铵。(4) YNB 完全培养基: YNB 培养基中添加 50 μ g/mL 组氨酸、50 μ g/mL 色氨酸、50 μ g/mL 亮氨酸、50 μ g/mL 尿嘧啶。(5) 亮氨酸、尿嘧啶双缺陷型培养

基 (DM-leu⁻, ura⁻): YNB 培养基中添加 50 μg/mL 组氨酸、50 μg/mL 色氨酸。

1.1.3 培养条件: (1) *E. coli* JM109 培养条件: 从 LB 平板上挑取 *E. coli* JM109 单菌落至加有 20 mL LB 的 250 mL 的摇瓶中, 放置于 37℃ 转速为 200 r/min 的摇床上培养。(2) *S. cerevisiae* CEN. PK2-1D-Δubi4 培养条件: ① 化学法转化培养条件: 挑取 *S. cerevisiae* CEN. PK2-1D-Δubi4 单菌落至含有 20 mL YPD 的 250 mL 的摇瓶, 放置于 30℃ 转速为 200 r/min 的摇床上培养 12-16 h, 离心收集细胞制备感受态。② 生理实验条件: 从斜面中接种 1 环 *S. cerevisiae* CEN. PK2-1D-Δubi4 细胞于 20 mL 加有组氨酸和色氨酸的 YNB 培养基中, 放置于 30℃ 转速为 200 r/min 的摇床上。生长至对数中期, 以 5% 的转接量转接入含有 20 mL 的 YNB 培养基 (加入了生长所必需的氨基酸) 中, 于 30℃ 转速为 200 r/min 的摇床上生长到对数期离心收集细胞。用无菌水洗涤 2 次后, 在磷酸盐缓冲液中 (与所取菌液等体积) 重悬后制作玻片观察荧光。

1.2 DNA 操作

S. cerevisiae CEN. PK2-1D 总 DNA 的提取、感受态的制备采用 TaKaRa 的试剂盒, 质粒的转化用醋酸锂转化法^[10]。*E. coli* JM109 感受态的制备使用

生工生物工程 (上海) 股份有限公司一步法制备大肠杆菌感受态试剂盒。大肠杆菌质粒的提取用生工生物工程 (上海) 股份有限公司质粒提取试剂盒。DNA 片段回收, 纯化采用 Fermentas 公司相关的试剂盒。限制性内切酶、连接酶和 DNA 聚合酶等购买于 TaKaRa 公司。

1.3 pUbDetec16 表达载体的构建和转化

根据 NCBI 上发布的 *S. cerevisiae* S228C 的 *AGPI* 基因 (GenBank accession number: NC_001135) 序列设计引物, 用于从 *S. cerevisiae* 基因组中扩增基因和重组质粒的鉴定 (表 1), 引物两端分别加有 GAATTC 和 CCCGGG 酶切位点。用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *SmaI* 分别酶切载体 pUbDetec16 和 PCR 反应的产物, 把经过纯化的线性化的质粒和目标 DNA 片段以 1:4 的比例混合, 16℃ 连接过夜。将连接混合液转化 *E. coli* JM109, 涂布在含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上, 12 h 后随机挑选克隆子进行菌落 PCR 验证。挑选阳性转化子送上海生工测序。挑选测序正确的重组质粒利用醋酸锂转化法转化 *S. cerevisiae* CEN. PK2-1D-Δubi4, 涂布 DM-leu⁻, ura⁻ 平板。于 30℃ 培养箱培养 3-4 d, 挑选单菌落进行菌落 PCR 验证后接种相应的液体培养基。待生长至对数期转接以便于后续试验。

表 1. *AGPI* 定点突变所用引物

Table 1. Primers used for the site directed mutagenesis of *AGPI*

Primer	Sequence (5' → 3')
<i>AGPI</i> -F	CCG <u>GAATTC</u> ATGTCGTCGCGAAGTCTCTATAC
<i>AGPI</i> -R	TCC <u>CCCGG</u> GACACCAGAAGGCAACGACC
<i>AGPI</i> ^{K11R} -F	AAGTCTCTATACGAACTGAGAGACTTGAAAAATAGCTCC
<i>AGPI</i> ^{K11R} -R	GGAGCTATTTTTCAAGTCTCTCAGTTCGTATAGAGACTT
<i>AGPI</i> ^{K14R} -F	TACGAACTGAAAGACTTGAGAAATAGCTCCACAGAAATA
<i>AGPI</i> ^{K14R} -R	TATTTCTGTGGAGCTATTTCTCAAGCTTTTCAGTTCGTA
<i>AGPI</i> ^{K98R} -F	CAGGCTCAAGAACTAGAAAGAAATGAAAGTTCGGACAAC
<i>AGPI</i> ^{K98R} -R	GTTGTCCGAACCTTCATTTCTTTCTAGTTCCTTGAGCCTG
<i>AGPI</i> ^{K112R} -F	GGCGCTAATACAGGTCATAGTTCGGACTCGCTGAAGAAA
<i>AGPI</i> ^{K112R} -R	TTTCTTCAGCGAGTCCGACCTATGACCTGTATTAGCGCC
pUbDetec16-ver-F	GATAATGGTCTGCTAGTTGAACGCT
pUbDetec16-ver-R	TACTTCTGCTCATTAGAAAAGAAAG

The underlined letters refer to the restriction enzyme site.

1.4 荧光检测

重组质粒转化宿主后接种 DM-leu⁻, ura⁻ 液体培养基, 待生长至对数中期时。于 4000 × g, 5 min 离心去上清。用无菌水洗涤细胞, 重新在添加有相应氨基酸的 YNB 培养基 (不添加硫酸铵) 中重悬菌

体, 于 30℃、200 r/min 培养 90 min。使用分光光度计测定 *OD*₆₀₀, 并取 200 μL 于 96 孔全黑酶标板, 在发射光/激发光 = 485/524 条件下检测荧光强度。检测荧光前需对菌悬液进行预处理。取适量菌悬液, 离心去上清。再用 PBS 洗涤细胞, 再次离心去

上清,最后用等体积 PBS 重悬菌体,取 200 μL 于全黑的荧光酶标板上检测。分别计算其置信度^[7]。

1.5 不同氮源条件下的泛素化检测

转运蛋白 Agp1p 是受到 NCR 效应调控的氨基酸透性酶。为研究其在偏好型氮源及非偏好型氮源条件下的泛素化情况,在 YNB 培养基中分别添加终浓度为 10mmol/L 谷氨酰胺、精氨酸、脯氨酸或铵盐作为唯一氮源,在四种不同氮源条件下检测其荧光强度。荧光强度检测及预处理详见方法 1.4,通过检测其在不同氮源条件下的荧光强度来研究蛋白的泛素化过程。

1.6 泛素化位点定点突变

在以谷氨酰胺、精氨酸、脯氨酸或铵盐为唯一氮源的培养条件下, Agp1p 的泛素化置信度 (Ubiquitination confidence, Cu) 均较高。表明 Agp1p 的确受到泛素化调控。使用在线泛素化位点预测软件 UbPred^[8] 对 Agp1p 的泛素化位点进行预测,其中置信度较高的泛素化位点有第 11、14、98、112 位赖氨酸。对这 4 个赖氨酸位点分别进行突变,得到 7 个突变体组合: Agp1p^{K11R}, Agp1p^{K14R}, Agp1p^{K98R}, Agp1p^{K112R}, Agp1p^{K11-14R}, Agp1p^{K11-14+112R}, Agp1p^{K11-14+112-98R}。分别计算各突变体的荧光强度变化倍数 (Change fold, CF)。

$$CF = (F_{\text{阳}} - F_{\text{突变体}}) / (F_{\text{阳}} - F_{\text{阴}})$$
。F_阳: 阳性对照的单位荧光强度。F_{突变体}: 突变体的单位荧光强度。F_阴: 阴性对照的单位荧光强度。

1.7 泛素化位点突变对菌体尿素积累的影响

将活化的菌体接种至 DM-leu⁻, ura⁻, 并在培养基中添加终浓度为 10 mmol/L 的尿素。每 8 h 取样,培养 48 h,将样品于 4000 \times g, 2 min 离心得上清液。采用显色法测定上清液中尿素的含量。通过测定尿素含量的变化来研究 Agp1p 泛素化对氮源利用的影响^[11]。

1.8 泛素化位点突变对菌体氨基酸利用的影响

Agp1p 是一种特异性低,转运能力较强的转运蛋白, Agp1p 能够转运的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、丝氨酸、蛋氨酸、丙氨酸、谷氨酸、组氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、色氨酸、天冬酰胺等。为了研究泛素化位点突变对氨基酸转运以及菌体氮源利用的影响,通过在 YNB 培养基中 (不添加硫酸铵) 添加终浓度均为 5mmol/L 的天冬酰胺、谷氨酰胺、精氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、色

氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、脯氨酸,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 培养 48h 后,分别在 0 h 和 48 h 取样检测各种氨基酸的利用情况。

2 结果

2.1 重组质粒的构建及转化

以 *S. cerevisiae* CEN. PK2-1D 基因组为模板, PCR 扩增出 AGP1 基因片段。将 PCR 扩增所得的基因片段连接到 pMD-T Simple Vector 上测序验证,测序结果与 NCBI 的序列一致。随后将 AGP1 插入质粒 pUbDetec16,获得重组质粒 pUbDetec16-AGP1。用重组质粒转化 *S. cerevisiae* CEN. PK2-1D- Δ ubi4, 随后挑取转化子通过验证引物 pUbDetec16-ver-F/R (见表 1) 进行菌落 PCR 验证。

2.2 转运蛋白 Agp1p 荧光检测

进行荧光检测时,由于酪蛋白水解物中氨基酸含量丰富,在培养基中添加 0.25% 的酪蛋白水解物能够诱导蛋白泛素化,从而增加阴性对照及阳性对照间的差异。将活化的菌体接种 DM-leu⁻, ura⁻, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 摇床培养至对数生长期。添加终浓度为 0.25% 酪蛋白水解物后继续培养 90 min,制作玻片观察荧光^[12]。以转化了质粒 pUbDetec16 的菌

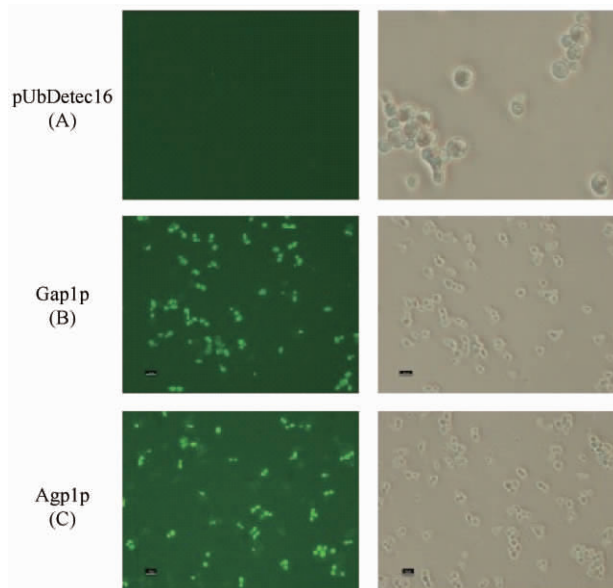


图 2. Agp1p 及对照荧光图片

Figure 2. Fluorescence of Agp1p and the control. (A) Gap1p refers to positive control; (B) pUbDetec16 refers to negative control; (C) The figure of Agp1p.

株为阴性对照;转运蛋白 Agp1p 受到泛素化调控^[4],故以转化了 pUbDetec16-GAP1 质粒的菌株为阳性对照。在荧光显微镜下,阴性对照检测不到荧光;阳性对照有较强的荧光信号,如图 2。荧光检测及泛素化置信度比较结果说明转运蛋白 Agp1p 受到泛素化调控。

2.3 不同氮源条件下 Agp1p 的泛素化检测

图 3 表明,分别以谷氨酰胺、精氨酸、铵盐或脯氨酸为唯一氮源条件下,转运蛋白 Agp1p 的泛素化置信度有较大的变化。泛素化置信度能够准确地反应蛋白的泛素化过程的强弱。这 4 种氮源中谷氨酰胺、铵盐属于偏好型氮源,精氨酸、脯氨酸则属于非偏好型氮源,当培养基中含有偏好型氮源时,酿酒酵母会优先利用偏好型氮源而抑制非偏好型氮源的利用。因此当培养基存在优势氮源谷氨酰胺、铵盐时,只有特异性转运优势氮源的透性酶能够继续表达,而转运蛋白 Agp1p 的表达会受到抑制,同时细胞膜上的 Agp1p 也开始进入泛素-蛋白酶体降解途径,因而可以检测到较高的泛素化置信度。而当培养基存在非偏好型氮源精氨酸、脯氨酸时,胞外的氨基酸能够诱导转运蛋白 Agp1p 的表达,细胞膜上的 Agp1p 几乎不会受到泛素化调控。而当细胞中的氮源耗尽时,膜上的非必须的转运蛋白会进入泛素化途径从而进入液泡内降解,因而只能检测到较低的荧光信号。

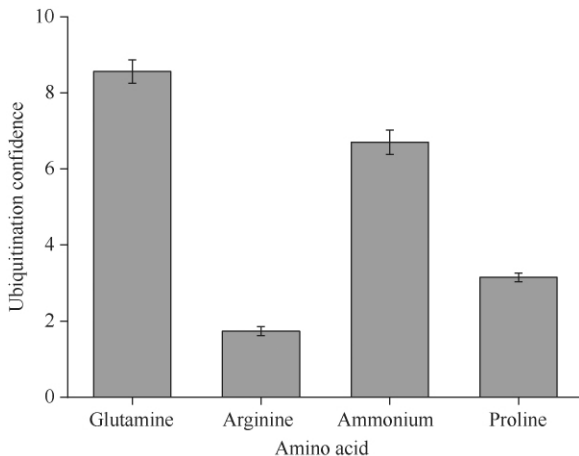


图 3. 不同氮源条件下转运蛋白 Agp1p 泛素化置信度
Figure 3. The ubiquitination confidence of Agp1p under different nitrogen source.

2.4 泛素化位点定点突变及其对 Agp1p 泛素化的影响

通过比较对照及各突变体间的荧光强度变化倍

数(计算方法详见 1.6),可以发现不同突变体的荧光强度均有一定程度的减弱,如图 4 所示。在 4 个单突变体中,第 11、14、112 位赖氨酸突变后,荧光强度变化较小,其中 Agp1p^{K11R} 的荧光强度几乎没有变化。结合突变体 Agp1p^{K11-14R} 的荧光强度变化,表明第 11 位赖氨酸位点可能并非其潜在的泛素化位点,而第 14 位的赖氨酸位点可能是其潜在的泛素化位点。比较突变体 Agp1p^{K11-14R}、Agp1p^{K112R} 和 Agp1p^{K11-14-112R} 的荧光强度变化,表明第 112 位赖氨酸位点可能是其潜在的泛素化位点。第 98 位赖氨酸位点突变后荧光强度减弱最为显著。表明第 98 位赖氨酸位点可能是 Agp1p 的潜在的泛素化位点。通过突变体的荧光强度变化能够初步判断第 14、98、112 位赖氨酸位点是潜在的泛素化位点,而第 11 位的赖氨酸位点并非其泛素化位点。以上结果说明这 4 个赖氨酸位点对于 Agp1p 的泛素化调控虽然影响程度不同,但的确可以改变其泛素化过程。

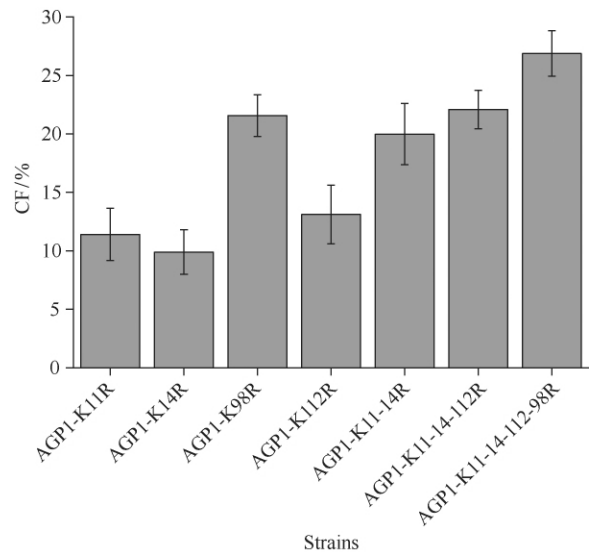


图 4. 转运蛋白各突变体荧光强度的变化

Figure 4. The change fold of fluorescence of Agp1p mutant strains.

2.5 泛素化位点突变对菌体尿素积累的影响

泛素化位点突变结果表明,泛素化位点的突变对 Agp1p 的泛素化调控有影响。为了研究 Agp1p 受到泛素化的变化是否会影响菌体氮源的利用,本研究检测了突变体对尿素的利用情况。结果显示,过量表达单点突变 Agp1p 的菌体尿素积累量变化不大,而过量表达复合突变 Agp1p 的菌体的尿素积累量变化较为明显,过量表达四重突变体

Agp1p^{K11-14-98-112R}的菌体的尿素积累量最高(如图5)。赖氨酸位点突变后,转运蛋白 Agp1p 的泛素化程度降低,Agp1p 的泛素-蛋白酶体途径受到抑制,导致酿酒酵母对其他代谢途径转化的氮源利用率提高,

大量的氮源代谢使细胞内尿素过度积累。酿酒酵母细胞内大量的尿素又能通过转运蛋白 Dur4p 转运至胞外。

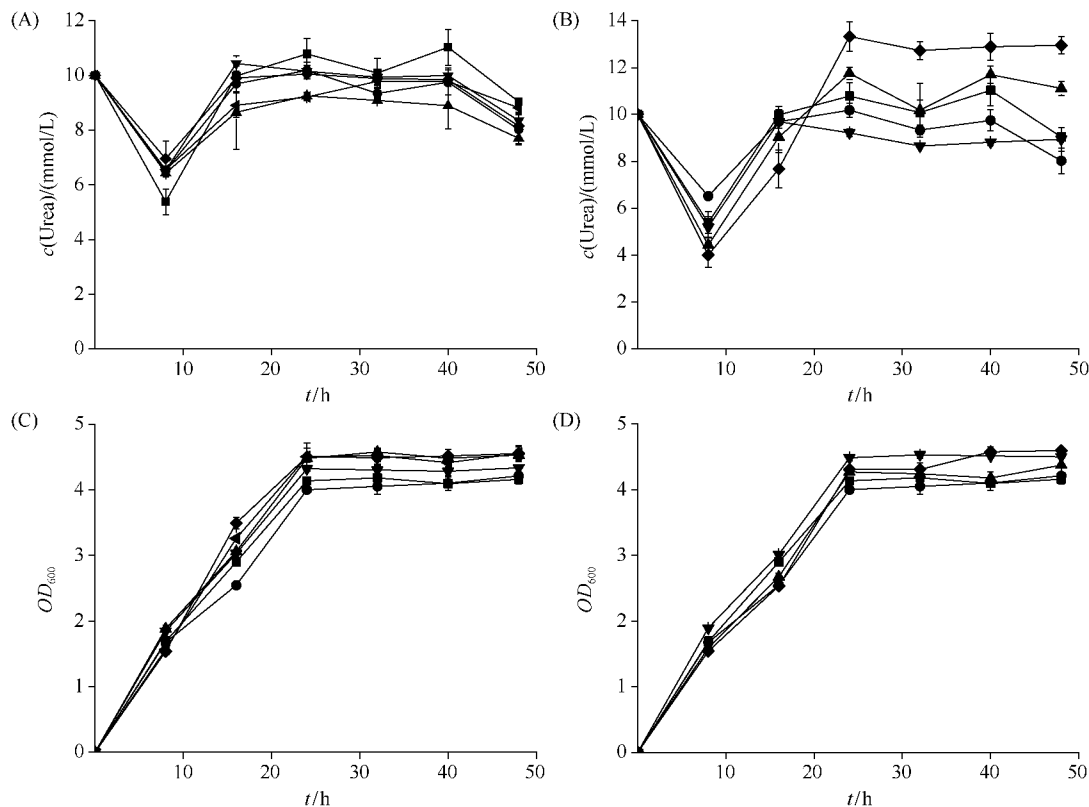


图 5. Agp1p 及系列突变体的尿素利用及细胞生长情况

Figure 5. Urea utilization and growth of Agp1p and mutant strains. A: Urea utilization of single mutants; B: Urea utilization of multiple mutants; C: Growth of single mutants; D: Growth multiple mutants. A-C: \blacksquare pUbdetec16, \bullet pUb16-Agp1p, \blacktriangledown pUb16-Agp1p^{K11R}, \blacktriangle pUb16-Agp1p^{K14R}, \blacklozenge pUb16-Agp1p^{K98R}, \blacktriangleleft pUb16-Agp1p^{K112R}. B-D: \blacktriangledown pUbdetec16, \bullet pUb16-Agp1p, \blacksquare pUb16-Agp1p^{K11-14R}, \blacktriangle pUb16-Agp1p^{K11-14-112R}, \blacklozenge pUb16-Agp1p^{K11-14-98-112R}.

2.6 泛素化位点突变对菌体氨基酸利用的影响

转运蛋白 Agp1p 能够转运的氨基酸涉及十几种之多^[13]。所转运的氨基酸包括了非极性、极性氨基酸、碱性氨基酸及酸性氨基酸等各种氨基酸。从酿酒酵母氮源偏好型分类,天冬酰胺、谷氨酰胺为典型的偏好型氮源,精氨酸、脯氨酸是典型的非偏好型氮源,其余的氨基酸则不是 NCR 效应中的典型氮源^[12]。为了研究泛素化对氮源利用的影响,分别选取了天冬酰胺、谷氨酰胺、精氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、亮氨酸、脯氨酸这九种氨基酸来研究菌体氮源代谢水平。表 2 结果显示,天冬酰胺、谷氨酰胺、甲硫氨酸、色氨酸、苯丙氨酸和亮氨酸

的利用率较高,而精氨酸、丙氨酸、脯氨酸的利用率相对较低。分析其原因可能是由于天冬酰胺、谷氨酰胺等属于偏好型氮源,酵母菌会优先利用,而精氨酸、脯氨酸等为非偏好型氮源,偏好型氮源的利用会抑制非偏好型氮源的利用。此外还可能是由于转运蛋白 Agp1p 对于各种氨基酸的转运能力不同导致的。通过比较突变体与野生型的氮源利用率可以发现,相对于野生型 Agp1p 而言,三重突变体的氮源利用率变化均显著,而四重突变体的氮源利用率变化最为显著,其中天冬酰胺、甲硫氨酸、亮氨酸变化最为明显。此结果与尿素利用研究中,四重突变体的尿素积累量最大较一致,其原因可能是由于泛素

化位点突变后的转运蛋白进入泛素-蛋白酶体途径受阻,能够在细胞膜上维持较长时间的转运胞外氨基酸,从而提高菌体氮源利用率。天冬酰胺是偏好性氮源,易于菌体利用,因而利用率较高;其次甲硫氨酸是多肽合成的起始氨基酸,大量的生理代谢活动需要不断合成新的多肽^[14];亮氨酸是一种主要的

支链氨基酸,能够促进菌体的生理代谢,这些氨基酸利用率均较高。此外,其余的氨基酸的利用率没有显著地提升有以下原因:(1)转运蛋白 Agp1p 对各种氨基酸的转运能力有所不同;(2)酿酒酵母对偏好型氮源的吸收利用及 NCR 效应调控,以及其它氮源代谢途径(如 SPS 途径、GCN4 调控途径)等。

表 2. pUbDetec16 及 Agp1p 系列突变体及对照氨基酸利用情况

Table 2. Amino acid utilization of Agp1p mutants and pUbDetec16

Amino acid	pUbDetec16		Agp1p		Agp1p ^{K11,14,112R}		Agp1p ^{K11,14,98,112R}	
	Consumption R/%		Consumption R/%		Consumption R/%		Consumption R/%	
Asn	170.63 ± 0.98 ^a	32	275.71 ± 2.77 ^b	56	276.96 ± 1.55 ^b	56	308.48 ± 1.12 ^c	62
Gln	164.44 ± 1.67 ^a	33	301.48 ± 2.00 ^b	58	258.46 ± 0.79 ^b	53	280.29 ± 0.70 ^b	57
Arg	67.89 ± 2.51 ^a	14	87.00 ± 2.46 ^a	15	97.31 ± 2.61 ^a	17	131.34 ± 1.09 ^b	28
Ala	106.19 ± 0.68 ^a	20	110.07 ± 1.00 ^a	22	115.18 ± 1.52 ^b	25	134.19 ± 2.16 ^b	28
Met	176.85 ± 1.91 ^a	32	186.30 ± 1.39 ^a	39	204.18 ± 1.56 ^b	41	234.82 ± 2.39 ^c	48
Trp	179.26 ± 1.63 ^a	33	225.72 ± 2.83 ^b	45	236.74 ± 2.70 ^b	47	241.98 ± 0.35 ^b	49
Phe	164.87 ± 2.61 ^a	31	225.02 ± 2.92 ^b	48	239.55 ± 2.77 ^b	48	238.19 ± 3.52 ^b	49
Leu	207.42 ± 2.22 ^a	40	216.93 ± 3.19 ^a	43	230.32 ± 2.81 ^a	46	253.85 ± 2.11 ^b	50
Pro	106.73 ± 2.29 ^a	21	113.65 ± 2.01 ^a	23	116.02 ± 1.13 ^a	24	120.83 ± 2.61 ^a	25

The values of amino acid consumption are means of three experiments. Different letters in the same row indicate significant differences ($p < 0.05$)

3 讨论

本研究通过构建 *S. cerevisiae* 细胞膜上的氨基酸转运蛋白 Agp1p 的泛素化检测载体,在 4 种氮源谷氨酰胺、精氨酸、脯氨酸及铵盐为唯一氮源条件下研究其泛素化情况^[15]。4 种氮源中谷氨酰胺、铵盐为偏好型氮源;精氨酸、脯氨酸则是非偏好型氮源。在 4 种不同氮源条件下,Agp1p 的泛素化情况均不相同。表明 Agp1p 的泛素化过程受到不同氮源的影响。进一步验证了膜转运蛋白 Agp1p 受到泛素化调控,并且其泛素化调控受到胞外氮源的影响^[4]。此外,将转运蛋白的潜在的泛素化位点赖氨酸突变为精氨酸后,突变体的荧光强度均出现一定程度地减弱。表明转运蛋白泛素化位点突变能够影响其泛素化过程。通过比较转运蛋白 Agp1p 及系列突变体的尿素利用,发现泛素化位点的突变对于菌体尿素利用确实有影响,其中四重突变体 Agp1p^{K11-14-98-112R} 尿素积累显著提高。分析其原因可能是由于泛素化位点的突变使转运蛋白 Agp1p 的泛素化受到抑制。突变后的转运蛋白 Agp1p 由于泛素化过程受阻,从而能够持续的转运胞外氨基酸,此时氨基酸利用所产生的代谢产物尿素浓度将进一步

提高。由于转运蛋白 Agp1p 能够转运大多数氨基酸,通过比较对照及突变体对九种氨基酸的代谢水平可以发现,转运蛋白 Agp1p 能够提高大部分氨基酸的代谢水平,其中四重突变体的氨基酸代谢水平显著提高。表明转运蛋白的泛素化调控对菌体氮源利用具有重要影响。除转运蛋白 Agp1p 外,还有一些转运蛋白如 Dal5p、Bap2p、Mup1p、Stp1p 等都受到泛素化调控^[16-19]。泛素化调控途径对于酿酒酵母维持细胞内氨基酸的转运具有重要的作用,并且受到多种胞外环境的诱导^[20]。研究表明,酿酒酵母的泛素化途径与细胞内多种信号调控途径有关,如 TOR 途径、SPS 信号途径等^[16]。正是由于细胞内这种复杂的调控网络,酿酒酵母能够根据胞外环境的改变做出精确的调控。

Shema 等采用蛋白质组学、蛋白质免疫印迹方法研究组蛋白 H2B 的泛素化调控,该方法缺点是步骤复杂,不能实时检测活细胞内的蛋白质的泛素化^[21]。本研究采用双分子荧光互补技术检测转运蛋白 Agp1p 的泛素化,可以实时检测蛋白在活细胞内的泛素化修饰,操作简单方便。通过构建泛素化检测重组质粒、泛素化位点突变、突变体氨基酸代谢等实验来研究其泛素化调控过程及其对于酿酒酵母氮源利用的影响。

在掌握了转运蛋白的泛素化调控的基础上结合基因转录水平的调控, 能够更精确的改造酿酒酵母氮源的利用顺序及效率。近些年来随着转录组学、蛋白质组学研究手段的不断提高, 许多未知的透性酶被报道。本课题中的研究思路及方法对于研究其他透性酶的泛素化过程具有一定的借鉴意义。然而要想深入理解其泛素化调控机理, 还需要更多关于泛素化的研究工作来进一步完善。在掌握了氮源透性酶表达和调控机理的基础上, 利用现在的分子生物学方法改变菌体对胞内或环境中氮源的利用顺序以解除酿酒酵母氮源代谢阻遏效应, 防止菌体生长代谢过程中有害物质的产生, 从而充分提高培养原料的利用效率。

参考文献

- [1] Hofman-Bang J. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biotechnology*, 1999, 12(1): 35-73.
- [2] Tate JJ, Georis I, Dubois E, Cooper TG. Distinct phosphatase requirements and GATA factor responses to nitrogen catabolite repression and rapamycin treatment in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biology Chemistry*, 2010, 285(23): 17880-17895.
- [3] Cunningham TS, Andhare R, Cooper TG. Nitrogen catabolite repression of DAL80 expression depends on the relative levels of Gat1p and Ure2p production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biology Chemistry*, 2000, 275(19): 14408-14414.
- [4] Merhi A, Andre B. Internal amino acids promote Gap1 permease ubiquitylation via TORC1/Npr1/14-3-3-dependent control of the Bul arrestin-like adaptors. *Molecular and Cellular Biology*, 2012, 32(22): 4510-4522.
- [5] Risinger AL, Cain NE, Chen EJ, Kaiser CA. Activity-dependent reversible inactivation of the general amino acid permease. *Molecular Biology of the Cell*, 2006, 17(10): 4411-4419.
- [6] Galan JM, Moreau V, Andre B, Volland C, Haguenaer-Tsapis R. Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *Journal of Biology Chemistry*, 1996, 271(18): 10946-10952.
- [7] Lv Y, Zhou J, Liu L. Ubiquitination Detection of NCR Related Permeases and Regulators. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2014, 33(6): 576-582. (in chinese)
- [8] 吕永坤, 周景文, 刘龙. 氮代谢调控相关蛋白质泛素化修饰筛选. *食品与生物技术学报*, 2014, 33(6): 576-582.
- [9] Radivojac P, Vacic V, Haynes C, Cocklin RR, Mohan A, Heyen JW, Goebel MG, Iakoucheva LM. Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 2010, 78(2): 365-380.
- [10] Lv Y, Zhao X, Liu L, Du G, Zhou J, Chen J. A simple procedure for protein ubiquitination detection in *Saccharomyces cerevisiae*: Gap1p as an example. *Journal of Microbiology Methods*, 2013, 94(1): 25-29.
- [11] Tumusiime S, Zhang C, Overstreet MS, Liu ZC. Differential regulation of transcription factors Stp1 and Stp2 in the Ssy1-Ptr3-Ssy5 amino acid sensing pathway. *Journal of Biology Chemistry*, 2011, 286(6): 4620-4631.
- [12] Zhao X, Zou H, Fu J, Zhou J, Du G, Chen J. Metabolic engineering of the regulators in nitrogen catabolite repression to reduce the production of ethyl carbamate in a model rice wine system. *Applied Environmental Microbiology*, 2014, 80(1): 392-398.
- [13] Risinger AL, Kaiser CA. Different ubiquitin signals act at the Golgi and plasma membrane to direct GAP1 trafficking. *Molecular Biology of the Cell*, 2008, 19(7): 2962-2972.
- [14] Schreve JL, Sin JK, Garrett JM. The *Saccharomyces cerevisiae* YCC5 (YCL025c) gene encodes an amino acid permease, Agp1p, which transports asparagine and glutamine. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(9): 2556-2559.
- [15] Menant A, Barbey R, Thomas D. Substrate-mediated remodeling of methionine transport by multiple ubiquitin-dependent mechanisms in yeast cells. *Embo Journal*, 2006, 25(19): 4436-4447.
- [16] Courchesne WE, Magasanik B. Ammonia regulation of amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 1983, 3(4): 672-683.
- [17] Abdel-Sater F, Jean C, Merhi A, Vissers S, Andre B. Amino acid signaling in yeast: activation of Ssy5 protease is associated with its phosphorylation-induced ubiquitylation. *Journal of Biology Chemistry*, 2011, 286(14): 245-257.
- [18] Burnside K, Lembo A, Harrell MI, Gurney M, Xue L, Tran NTB, Connelly JE, Jewell KA, Schmidt BZ, de los

- Reyes M, Tao WA, Doran KS, Rajagopal L. Serine/Threonine phosphatase Stp1 mediates post-transcriptional regulation of hemolysin, autolysis and virulence of group B *Streptococcus*. *Journal of Biology Chemistry*, 2011, 286 (51) : 44197-44210.
- [18] Omnus DJ, Ljungdahl PO. Stp1 latency is dependent on a small conserved motif in the N-terminal domain. *Yeast*, 2013, 30 (2) : 50-55.
- [19] Wielemans K, Jean C, Vissers S, Andre B. Amino acid signaling in yeast: Post-genome duplication divergence of the Stp1 and Stp2 transcription factors. *Journal of Biology Chemistry*, 2010, 285 (2) : 855-865.
- [20] Stolz A, Besser S, Hottmann H, Wolf DH. Previously unknown role for the ubiquitin ligase Ubr1 in endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2013, 110 (38) : 15271-15276.
- [21] Shema E, Oren M, Minsky N. Detection and characterization of ubiquitylated H2B in mammalian cells. *Methods*, 2011, 54 (3) : 326-330.

Effects of transporter Agp1p ubiquitination on nitrogen utilization in *Saccharomyces cerevisiae*

Yingyu Li, Yongkun Lv, Jingwen Zhou, Guocheng Du, Jian Chen*

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education; School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] The purpose of this work is to study the effects of ubiquitination of key nitrogen transporter Agp1p on nitrogen utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. [Methods] The ubiquitination detection vector to examine the ubiquitination process of Agp1p was constructed based on the bimolecular fluorescence complementation technology. The site-directed mutagenesis on the potential ubiquitination sites were performed to verify the effect on its ubiquitination regulation and nitrogen utilization. [Results] Agp1p can be ubiquitinated on the medium with glutamine, arginine, proline or ammonium. The fluorescence levels of mutant strains were down-regulated compared to the wild type strain. The quadruple mutant Agp1p^{K11-44-98-112R} achieved the lowest level among all strains. The ubiquitination process could be significantly repressed by removing the potential ubiquitination residues. Furthermore, flask-shaking experiments with nine amino acids or urea as sole nitrogen source showed that the effect of nitrogen utilization efficiency in the quadruple mutant was the highest. [Conclusion] Ubiquitination was involved in the regulation of Agp1p. Site-directed mutagenesis of potential ubiquitination sites of the transporter could significantly affect the nitrogen utilization process by altering the ubiquitination process.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, ubiquitination, permease, bimolecular fluorescence complementation, transporter Agp1p

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Major Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2012CB720802) and by the Key Project of Chinese National Natural Science Foundation (31130043)

* Corresponding author. Tel: +86-510-85918312; Fax: +86-510-85918309; E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

Received: 26 August 2014 / Revised: 15 December 2014