

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(9):984-991; 4 September 2014
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.09.003

粗糙脉孢菌转录因子 LAH-3 参与渗透压调控

高文双[#], 王志隽[#], 王颖^{*}

中国农业大学生物学院, 农业生物技术国家重点实验室, 农业微生物资源及其利用农业部重点实验室, 北京 100193

摘要:【目的】通过构建转录因子 *lah-3* 基因缺失突变体, 研究 *lah-3* 基因缺失突变体菌株的渗透压表型, 进而探究 *lah-3* 基因在渗透压调控中的作用。【方法】采用同源基因重组敲除技术构建 *lah-3* 基因缺失突变体。用 4% NaCl 和 1 mol/L Sorbitol 进行渗透压处理。利用 Northern blot 检测渗透压应答基因的表达。利用 Western blot 检测 LAH-3 蛋白磷酸化修饰水平, OS-2 蛋白的表达水平及其磷酸化修饰水平。【结果】在转录因子 *lah-3* 基因缺失突变体中, 渗透压应答基因 *gcy-1*、*stl-1* 以及 *pck-1* 的表达水平都明显降低, 而且在渗透压刺激下, LAH-3 蛋白磷酸化修饰水平升高。LAH-3 的磷酸化修饰不受 OS-2 调控。*lah-3* 基因的缺失既不影响 OS-2 蛋白的表达水平, 也不影响其在渗透压刺激后的磷酸化修饰。【结论】粗糙脉孢菌中转录因子 LAH-3 参与调控渗透压应答基因的转录, 但其响应过程不依赖于 OS-2 MAPK 信号通路。

关键词:粗糙脉孢菌, 渗透压, OS-2 MAPK, 转录因子 LAH-3

中图分类号:Q933 **文章编号:**0001-6209(2014)09-0984-08

地球上的生物随时都有可能受到环境中的渗透压胁迫。细胞应对渗透压胁迫的过程对于生物的生存至关重要。MAP 激酶家族是广泛存在于真核生物细胞中的一类参与渗透压调控的信号通路, 它们一般由 3 个级联激活的激酶组成: MAPKKK、MAPKK 以及 MAPK。真核生物中存在许多 MAPKKK、MAPKK 以及 MAPK 激酶家族, 这些家族分工明确, 功能不同。每一组 MAPK 激酶都被特定的刺激激活并导致特定的适应性应答反应。在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中, 生存环境中渗透压的变化可以影响多条信号通路, 但是, 目前研究最清楚的是 Hog1 (high osmolarity glycerol) MAPK 信号途径。Hog1 似乎只是特异地对外界增高的渗透压

做出反应^[1-3]。除植物外, Hog1 在真菌和哺乳动物中都有同源蛋白^[4]。不同的是, 哺乳动物的同源蛋白 p38 所在的信号通路不仅可以对多种环境胁迫做出应答, 还可以对一些细胞因子、生长因子以及病原体等的作用做出反应^[5-6]。裂殖酵母的同源蛋白 Spc1/Sty1 除了可以对渗透压做出应答外, 还可以被热激以及氧化胁迫激活^[7]。

基因的应激性激活表达在细胞应对渗透压胁迫过程中起着关键作用。基因芯片研究表明在渗透压刺激下有大约 600 个基因表达上调^[8]。最近的研究表明这些众多基因的激活表达是由 Hog1 通过调控几个转录因子的活性介导的。细胞在受到渗透压胁迫后, Hog1 迅速被磷酸化激活进而激活下游应答基

基金项目:教育部博士点基金(20110008110027); 教育部科学技术研究重点项目(108015)

^{*} 通信作者。Tel: + 86-10-62731206; E-mail: wangying@cau.edu.cn

作者简介:[#]共同第一作者。高文双(1987-), 女, 山东人, 硕士研究生, E-mail: gwsh1987@gmail.com; 王志隽(1988-), 女, 黑龙江人, 硕士研究生, E-mail: wangzhijun1012@gmail.com

收稿日期:2013-11-14; **修回日期:**2014-03-06

因如 *STL1*、*GRE2* 或者 *GPD1*, 这一过程仅仅需要 1–3 min 的时间。实际上,在渗透压胁迫下,酵母中有大约 500 个基因 10 min 内能被激活并活跃转录^[9–11]。在激活下游应答基因过程中,参与渗透压调控的转录因子起着重要作用。酿酒酵母负责渗透压应答反应的转录因子包括: *Skol1/Acr1*、*Hot1*、*Msn1*、*Sgd1*。越来越多的研究揭示了这些转录因子的作用机制^[12]。进入细胞核以后, *Hog1* 通过调控几个转录因子的活性进而调控了众多基因的表达。

哺乳动物细胞中, *TonEBP/OREBP* (*TonE binding protein/ORE binding protein*) 是特异性参与渗透压调控的重要转录因子。它可以被 *p38 MAPK*、*Fyn*、*PKAc*、*ATM* 以及 *JNK2* 等多条信号通路和渗透压调控激酶激活,进而调控有机渗透物质生成及积累的基因的表达,因此在渗透压应答过程中发挥着重要作用。一些渗透压非特异性转录因子 *NF- κ B*^[13–14]、*HSF*^[15]、*CREB*^[16] 以及 *STAT*^[17] 等也参与到了渗透压应答过程中,以协助细胞应对高盐胁迫。

粗糙脉孢菌中的 *OS-4*、*OS-5* 和 *OS-2* 信号通路与酿酒酵母的 *Ssk2/Ssk22* *MAPKKK*、*Pbs2* *MAPKK*^[18] 和 *Hog1* *MAPK*^[19] 通路同源都参与渗透压胁迫的调控。但是粗糙脉孢菌中渗透压调控通路仍有许多问题需要研究,如下游基因是如何被 *OS-2* *MAPK* 通路调控的,都有哪些相关转录因子参与其中。

本研究构建了转录因子 *lah-3* 的基因缺失突变体,检测 *lah-3* 基因缺失突变体的渗透压表型,发现转录因子 LAH-3 参与调控渗透压应答基因的转录,但不依赖于 *OS-2* *MAPK* 的信号通路。这些工作将为粗糙脉孢菌中渗透压调控机制的研究和其他物种中的相关研究提供借鉴和参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:粗糙脉孢菌 87-3 (*bd*, *a*), 4200 (*non-bd*, *a*) 野生型菌株,本实验室保存;粗糙脉孢菌 *ku70^{RIP}* (*bd*, *a*) 基因敲除宿主菌株,可通过定向引入潮霉素抗性基因 *hph* 进行基因定向敲除,本实验室保存;粗糙脉孢菌 301-6 (*bd*, *his-3*, *A*), 组氨酸营养缺陷型菌株,可作为相关表达载体转化的宿主

菌株,本实验室保存;质粒载体 *pqa-5Myc-6His* 和 *pqa-3Flag* 均由本实验室保存。

1.1.2 主要仪器:超净工作台,分光光度计,微型台式真空泵,电热恒温培养箱,恒温摇床,移液器,台式高速冷冻离心机,电穿孔仪,水浴锅,聚丙烯酰胺凝胶电泳仪,漩涡振荡器,PCR 基因扩增仪,核酸电泳槽及电泳仪,磁力搅拌器等。

1.2 粗糙脉孢菌基因缺失突变株的构建

本研究采用 Colot 等建立的方法来构建基因缺失突变株^[20]。利用同源重组的原理,用潮霉素抗性基因 *hph* 置换目标基因的开放阅读框 (*open reading frame*, *ORF*)。从野生型菌株 87-3 基因组中分别扩增出 *lah-3* 基因 *ORF* 上、下游约 1 kb 的 DNA 序列作为 5' flank 和 3' flank,经酶切后分别与潮霉素抗性基因 *hph* 连接,得到 5' flank + *hph* 片段和 3' flank + *hph* 片段。再以连接产物为模板通过 PCR 大量扩增出两组片段。将各 2 μ g 的这两组片段共转化粗糙脉孢菌 *ku70^{RIP}* 菌株,利用细胞进行有丝分裂时发生的同源重组,以潮霉素抗性基因 (*hph*) 替换宿主基因组中的 *lah-3* 基因,得到相应的基因缺失突变体,然后通过杂交或分生孢子过膜等方法得到纯合缺失突变体。

1.3 渗透压敏感表型检测

接种分生孢子至斜面基本培养基上,室温、光下培养 4–7 d。制备基本平板培养基,以及分别含有 4% *NaCl* 和 1 mol/L *Sorbitol* 的平板培养基。挑取成熟分生孢子至装有无菌 *ddH₂O* 的离心管中,制成孢子悬液。吸取 5 μ L 孢子悬液分别滴在 3 种平板培养基的中心位置,静置至孢子悬液中的水分被培养基充分吸收。将接种好的平板置于 25 $^{\circ}$ C 黑暗培养箱中正置培养 48 h 左右,至基本培养基上菌丝刚刚长满整个平板,取出进行扫描。

1.4 粗糙脉孢菌可溶性蛋白的提取

接种分生孢子至斜面基本培养基上,室温、光下培养 4–7 d。将长好的分生孢子接种至相应的液体培养基中,30 $^{\circ}$ C 温箱静置培养 24 h 左右至菌膜形成,移至 25 $^{\circ}$ C 摇床中 140 r/min 培养 3–5 h。收集菌丝体样品置液氮中速冻,将样品在研钵中磨成均匀的粉末,并转移粉末至 1.5 mL 离心管中。将粉末样品置于冰上,加入蛋白提取缓冲液 (*extraction buffer*),蛋白提取缓冲液中需加入 3 种蛋白酶抑制剂 0.1% *PMSF*、0.01% *Leupeptin* 和 0.01%

Pepstatin。如果检测蛋白的磷酸化水平,需加入磷酸酶抑制剂至终浓度为:25 mmol/L NaF、10 mmol/L $\text{Na}_4\text{H}_2\text{PO}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2 mmol/L Na_3VO_4 、1 mmol/L EDTA。在漩涡振荡器上将粉末振荡重悬,12000 × g 4℃离心 15 min,将上清转移到离心管中。上清即为细胞的总蛋白。

1.5 Western blot

每个样品的上样量为 40 μg 总蛋白,总蛋白定量测定方法采用 Bio-rad 公司试剂盒。SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜上,随后添加一抗孵育, PBST 缓冲液洗涤,添加二抗孵育, PBST 缓冲液洗涤后添加 ECL 显影试剂并用 X 光片记录信号并显影。

1.6 Northern blot

每个样品的上样量为 20 μg 总 RNA,总 RNA 定量方法采用紫外分光光度法。总 RNA 甲醛变性电泳后毛细管吸附法转移至带正电的尼龙膜上并紫外交联好,在杂交炉中 65℃ 预杂交 1 h 以上,加入用体外转录法获得并过柱纯化的 RNA 探针 ($\alpha\text{-P}^{32}$ 标记的 UTP), 65℃ 杂交过夜, 68℃ 洗膜,压 X 光片并显影。

2 结果和分析

2.1 转录因子基因缺失突变体 *lah-3^{KO}* 对渗透压敏感

在渗透压平板实验中,我们发现 *lah-3^{KO}* 突变体有渗透压敏感表型。在 Minimal 培养基上 *lah-3^{KO}* 突变体长势较好,菌丝体布满整个平板,但是在加有 4% NaCl 和 1 mol/L Sorbitol 的培养基上菌丝生长却显著缓慢,只在平板中央形成一个小圈。作为对照,野生型菌株在 3 种培养基上的长势均好,而 OS-2 MAPK 途径中的 *os-2* 缺失突变体则表现了更为敏感的表型,无论在何种高渗培养基上,菌丝体都不能生长(图 1)。这一结果暗示我们,*lah-3* 很有可能参与到了渗透压调控过程中。

2.2 LAH-3 影响渗透压应答下游基因的表达

lah-3^{KO} 突变体表现的渗透压敏感表型以及 LAH-3 蛋白在渗透压刺激下发生的磷酸化修饰表明,LAH-3 很有可能参与到了渗透压调控过程中。为了进一步证实这一结果,我们用 Northern blot 检测了经 4% NaCl 处理 0、15、30、60 min 后野生型、*os-2^{KO}* 突变体以及 *lah-3^{KO}* 突变体中下游基因 mRNA

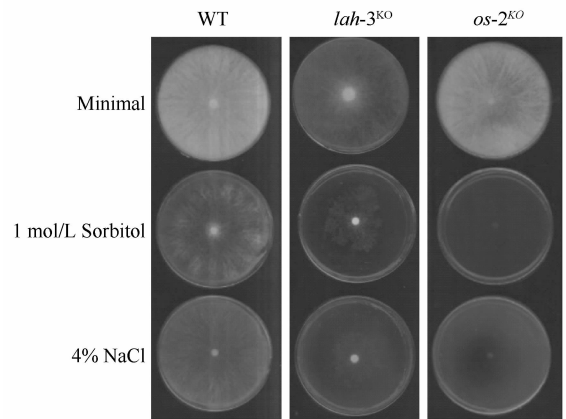


图 1. *lah-3^{KO}* 突变体对渗透压敏感

Figure 1. *lah-3^{KO}* mutant was sensitive to osmotic stress.

的水平。我们选取了 OS-2 MAPK 下游渗透压应答基因作为研究对象:*gcy-1* 编码甘油脱氢酶基因,是甘油合成过程中的一员;*stl-1* 是编码己糖转运蛋白的基因,参与到了糖运输过程中;*pck-1* 则参与糖异生过程,编码磷酸烯醇丙酮酸羧激酶基因。3 个基因都分别在不同的细胞生命过程中应对渗透压的胁迫。我们发现,野生型中(图 2),在未经 NaCl 处理时,*gcy-1* 和 *pck-1* 都有一定量的 mRNA 产生,在加入 NaCl 后,随着时间的推移,两个基因的 mRNA 的水平经历了先降低后升高的过程,在处理 60 min 后达到最高,表明细胞已对渗透压做出了应答反应。而 *stl-1* 的 mRNA 随着 NaCl 处理时间的延长,则是经历了从无到有并大量积累的过程。与我们已经了解的情况相一致,在 *os-2^{KO}* 突变体中,以上 3 种基因的 mRNA 水平非常低,而且也不存在随着高盐处理而出现表达水平振荡和提高的现象。而在 *lah-3^{KO}* 突变体中,*gcy-1* 和 *stl-1* 的 mRNA 水平虽然也有随着高盐处理时间延长而出现的振荡和提高,但是 mRNA 的量与野生型相比,明显降低。这一结果进一步证明了 LAH-3 确实参与到了粗糙脉孢菌的渗透压调控过程中。

2.3 LAH-3 在渗透压刺激下被磷酸化修饰

研究显示,酿酒酵母中参与渗透压调控的一些转录因子如 Sko1 和 Hot1 等在渗透压刺激下可以被磷酸化修饰。这种磷酸化修饰可以帮助转录因子成功进入细胞核,进而调控下游目标基因的表达。那么,LAH-3 蛋白在渗透压刺激下是否也会发生磷酸化修饰?

接下来我们将能够异位表达 Myc-LAH-3 蛋白

的菌株的分生孢子接入 1.5% 蔗糖液体培养基中, 25℃ 光照摇床中培养 20 h 左右, 用 4% NaCl 分别处理 0、15、30、60 min 后收集样品, 提取蛋白进行磷酸化修饰的检测。在蛋白提取过程中, 我们做了两组对比, 一组加入了磷酸酶抑制剂, 一组不加。同时, 我们取未经 NaCl 处理的蛋白 40 μg, 加入磷酸酶, 30℃ 消化 1 h, 以消除 LAH-3 蛋白可能存在的磷酸化修饰, 以此作为对照。结果显示 (图 3), 经磷酸酶

处理的 Myc-LAH-3 蛋白只有一条带, 约为 80 kDa 左右。与 0 min 的蛋白条带对比, 加入 4% NaCl 后的 Myc-LAH-3 蛋白条带出现明显的两条带, 暗示在渗透压刺激下, LAH-3 蛋白被磷酸化修饰。而在加入磷酸酶抑制剂后, 这种磷酸化修饰的变化更加明显。而 0 min 的蛋白条带也表现了明显的迁移变化, 说明在正常情况下, LAH-3 蛋白也存在一些修饰。

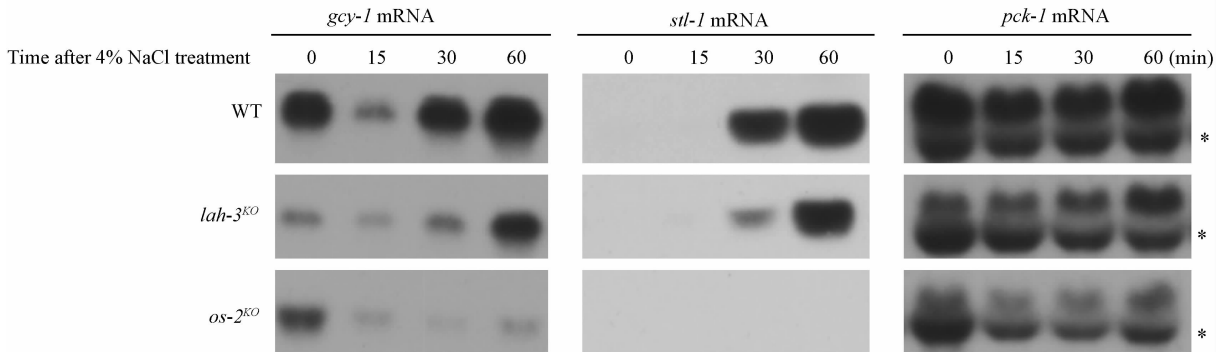


图 2. *lah-3* 缺失影响渗透压应答基因的表达

Figure 2. Impaired gene expression in a *lah-3* mutant strain upon osmossress.

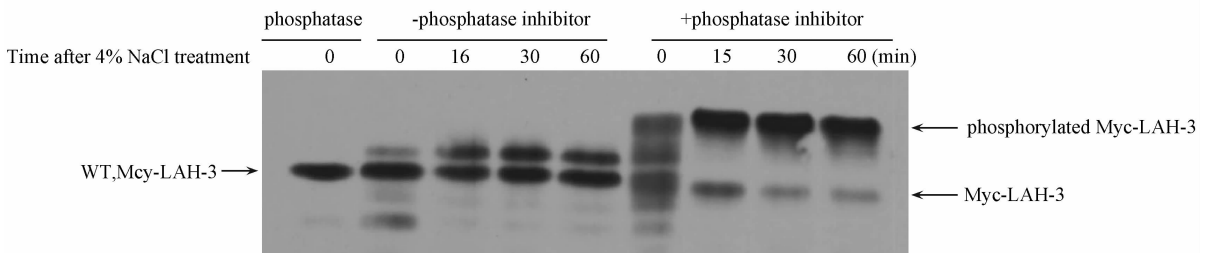


图 3. 渗透压刺激下, LAH-3 磷酸化修饰检测

Figure 3. The analysis of LAH-3 phosphorylation under osmossress.

2.4 LAH-3 磷酸化修饰的变化不受 OS-2 调控

酿酒酵母中 Hog1 可以磷酸化参与渗透压调控的转录因子, 进而调控下游应答基因的表达。那么 LAH-3 的磷酸化修饰是否是由 OS-2 介导的呢? 我们将表达载体 pqa-5Myc-6His-LAH-3 转入 *os-2^{KO}* 突

变体中, 并按照前面检测渗透压刺激下 Myc-LAH-3 蛋白磷酸化的方法, 对 *os-2^{KO}* 突变体以及 301-6 野生型菌株中的 LAH-3 在渗透压刺激下的蛋白磷酸化变化进行检测。结果显示 (图 4), *os-2^{KO}* 突变体中, 在没有 NaCl 处理时, LAH-3 蛋白呈弥散条带, 说明

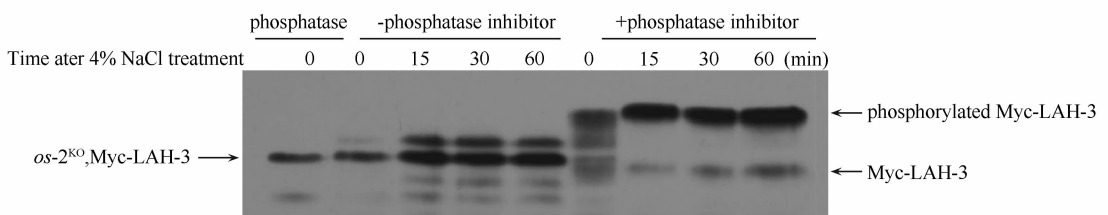


图 4. *os-2* 缺失不影响 LAH-3 蛋白在渗透压刺激下的磷酸化变化

Figure 4. Deletion of *os-2* has no effect on the phosphorylation of LAH-3 protein upon osmossress.

LAH-3 自身存在一些未知修饰。在加入 NaCl 15 min 后, LAH-3 蛋白即出现很高的迁移, 蛋白变大, 说明 LAH-3 被磷酸化修饰。这与在野生型菌株中 LAH-3 蛋白磷酸化修饰的变化情况是一样的。这说明 *os-2* 的缺失并没有影响 LAH-3 蛋白在渗透压刺激下发生的磷酸化变化, 因此 LAH-3 对渗透压刺激信号的响应是不依赖于 OS-2 蛋白的。

2.5 *lah-3* 的缺失不影响 OS-2 的蛋白水平和磷酸化水平

既然 LAH-3 的磷酸化不是由 OS-2 介导的, 那么 LAH-3 会不会在 OS-2 的上游行使功能呢? 接下来我们检测了渗透压刺激下 0、10、20、30、60 min 时野生型以及 *lah-3^{KO}* 突变体中 OS-2 蛋白总量的变化情况。结果发现, 不管是在野生型中还是 *lah-3^{KO}* 突变体中, 渗透压刺激下 OS-2 蛋白总量没有发生明显的变化(图 5)。这说明 *lah-3* 的缺失未对 OS-2 蛋白的表达产生影响, LAH-3 与 OS-2 之间无相关性。

酿酒酵母中 Hog1 在渗透压刺激下自身能够发生磷酸化的变化, 既然 LAH-3 不影响 OS-2 蛋白总量, 那会不会影响 OS-2 在渗透压条件下发生的磷酸化变化呢? 我们接着又利用 OS-2 磷酸化的抗体检测了 NaCl 处理下相同时间点时野生型以及 *lah-3^{KO}* 突变体中 OS-2 蛋白的磷酸化水平(图 5)。与之前研究报道相一致, 野生型中, 在未加入 NaCl 时, OS-2 蛋白的磷酸化水平非常低, 但是在加入 NaCl 仅 10 min 的时间里, OS-2 便达到了最高水平, 随着时间的推移, OS-2 磷酸化逐渐降低, 在 NaCl 处理 60 min 时基本又回到了本底水平。OS-2 的这一磷酸化变化趋势是与细胞适应渗透压胁迫的过程相一致的。而

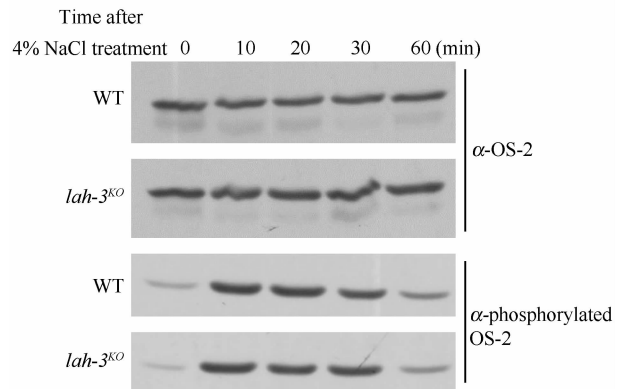


图 5. 渗透压刺激下, *lah-3* 的缺失不影响 OS-2 的蛋白水平和磷酸化水平

Figure 5. Deletion of *lah-3* does not influence the protein level and phosphorylation level of OS-2 upon osmossress.

在 *lah-3* 突变体中我们也观察到了与野生型中相同的 OS-2 磷酸化变化情况。这说明 *lah-3* 的缺失也不影响 OS-2 蛋白的磷酸化变化。

2.6 *lah-3^{KO} os-2^{KO}* 中下游基因 mRNA 水平比 *os-2^{KO}* 低

为了进一步确定 LAH-3 与 OS-2 MAPK 途径的关系, 我们构建了 *lah-3^{KO} os-2^{KO}* 双突变体, 检测了 *lah-3^{KO} os-2^{KO}* 双突变体、*os-2^{KO}* 单突变体以及 *lah-3^{KO}* 单突变体对下游基因 *gcy-1*、*stl-1* 和 *pck-1* mRNA 水平的影响(图 6)。Northern blot 结果显示 *lah-3^{KO} os-2^{KO}* 双基因的缺失完全破坏了 *gcy-1* 和 *pck-1* 对渗透压的应答, 我们几乎检测不到两者 mRNA 的转录, 这比 *os-2^{KO}* 单突变体所造成的影响还要严重一些。而在 *lah-3^{KO} os-2^{KO}* 双突变体以及 *os-2^{KO}* 单突变

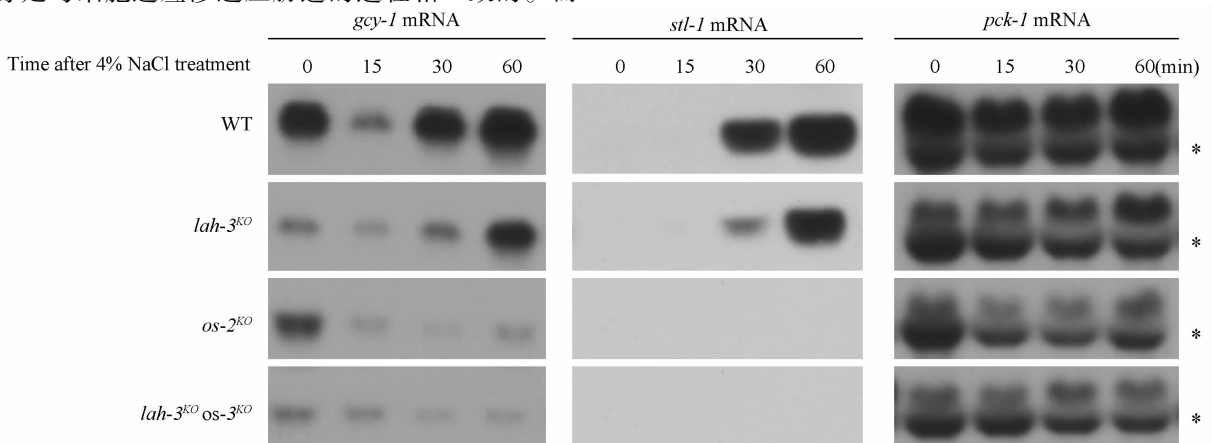


图 6. *lah-3^{KO} os-2^{KO}* 与 *lah-3^{KO}*、*os-2^{KO}* 对渗透压应答基因表达影响的对比

Figure 6. The different impacts on osmo-responsing gene expression in *lah-3^{KO} os-2^{KO}*, *lah-3^{KO}* and *os-2^{KO}* strains.

体中,我们检测不到 *stl-1* mRNA 的产生。双突变株中响应渗透压刺激的效应基因 mRNA 转录水平比任一单突变株的量都少甚至不转录的结果,可进一步确定 LAH-3 蛋白与 OS-2 蛋白分别存在于两条通路中,换句话说 LAH-3 并非存在于 OS-2 MAPK 调控通路中(图 7)。

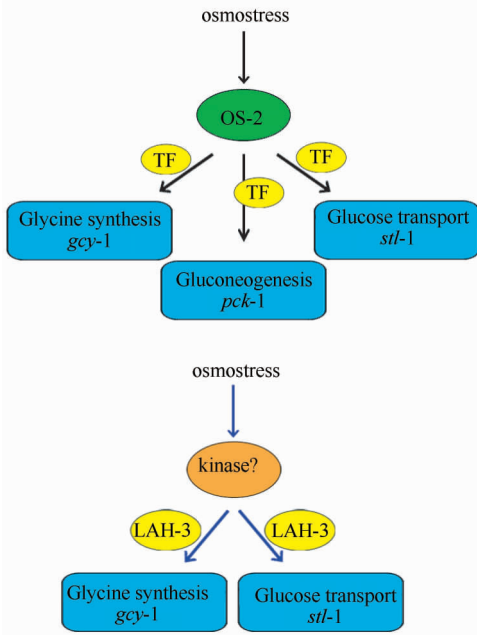


图 7. 粗糙脉孢菌中渗透压应答反应的示意图

Figure 7. A schematic diagram of osmo-adaptive responses in *Neurospora crassa*.

3 讨论

酵母中的 Hog1 可以磷酸化相关转录因子,例如转录因子 Sko1、Hot1 等,进而调控基因表达。但是我们的实验数据表明 LAH-3 虽然在渗透压刺激下能够被磷酸化修饰,但是这种磷酸化修饰并不是由粗糙脉孢菌中的 Hog1 同源蛋白 OS-2 介导的,因此 LAH-3 很有可能参与一条新的渗透压调控通路。在酵母中,负责渗透压调控的主要是 Hog1 MAPK 通路,另外也有研究表明 PKA 也参与到了渗透压调控过程中。在哺乳动物细胞中,渗透压的调控由多条通路参与,包括 p38 MAPK 途径、Fyn 途径等等。NCBI 比对结果显示,粗糙脉孢菌中与 p38 同源的蛋白是 OS-2,有 51% 的同源性;粗糙脉孢菌中与 Fyn 同源的蛋白是 NCU02234 (MAP kinase kinase, variant),有 28% 的同源性。

因此在粗糙脉孢菌中如果存在 OS-2 MAPK 以外的渗透压调控通路,是可以理解的。如果存在这种情况,那么对粗糙脉孢菌中参与渗透压调控的通路的研究,包括参与基因表达调控的转录因子的探究,信号是如何转导等生命过程都具有十分重要的生物学意义,一方面可以让我们更深刻的理解生物是如何应对复杂的外界生存环境;另一方面,可以为我们的研究高等哺乳动物的渗透压调控过程提供有意义的借鉴。

此外,我们在检测 LAH-3 蛋白的磷酸化修饰时发现,渗透压刺激导致 Myc-LAH-3 蛋白大小发生了明显的变化,从 100 kDa 左右增加至 130 kDa 左右,而且在 SDS-PAGE 上 Myc-LAH-3 蛋白迁移明显变化。那么渗透压刺激下发生的这么大的蛋白大小的变化,LAH-3 蛋白只存在磷酸化修饰的变化吗?会不会还有其它形式的修饰?我们分别用泛素以及 SUMO 的抗体检测用 Myc 抗体免疫沉淀下来的 LAH-3 蛋白,发现 LAH-3 并不存在泛素化及 SUMO 化这两种修饰,这暗示 LAH-3 在渗透压刺激下发生了多个位点的磷酸化修饰。这么多位点的磷酸化修饰暗示了 LAH-3 在参与渗透压调控过程中发挥的作用也许是多样与复杂的。

在应对渗透压胁迫过程中,基因转录水平的调控发挥着不可替代的重要作用。而参与基因调控的一些转录因子同样发挥着重要作用。酵母中参与渗透压调控的转录因子已有许多研究,但是大多都不保守。而在哺乳动物细胞中,虽然也有报道证明一些相关转录因子也参与到了渗透压调控过程中,但是具体的调控机制仍不清楚。由于哺乳动物细胞信号调控通路比较复杂,且很难进行遗传操作,一些研究方法无法实行。因此,脉孢菌作为遗传分析和生物化学研究的经典材料,它比酵母高等,却不如哺乳动物复杂,易于培养,便于进行遗传操作,很合适用来进行渗透压机制的研究,并为高等生物提供一些借鉴。

本文对粗糙脉孢菌中的转录因子 LAH-3 参与渗透压调控过程做了初步研究。平板筛选结果显示 *lah-3^{K0}* 突变体表现出渗透压敏感表型。Northern blot 结果显示, *lah-3^{K0}* 突变体中渗透压应答下游基因的转录水平降低。Western blot 结果显示,野生型菌株在渗透压的刺激下,LAH-3 蛋白发生了磷酸化修饰。这些实验结果都说明了 LAH-3 是通过影响

下游基因的转录,而调控渗透压应答的。但让我们意外的是,LAH-3 在渗透压刺激下发生的磷酸化修饰并不是由经典的渗透压应答途径中的 OS-2 MAPK 介导的,且 LAH-3 也不在 OS-2 的上游行使功能,这促使我们大胆猜测,在粗糙脉孢菌中可能存在着另外一条通路,也参与渗透压的调控过程。要想探究 LAH-3 参与渗透压调控的具体机制,还有待于进一步地研究。

参考文献

- [1] Ferrigno P, Posas F, Koepp D, Saito H, Silver PA. Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *The EMBO Journal*, 1998, 17(19): 5606-5614.
- [2] Alepuz PM, Jovanovic A, Reiser V, Ammerer G. Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Molecular Cell*, 2001, 7(4): 767-777.
- [3] Schüller C, Brewster JL, Alexander MR, Gustin MC, Ruis H. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *The EMBO Journal*, 1994, 13(18): 4382-4389.
- [4] Caffrey DR, O' Neill LA, Shields DC. The evolution of the MAP kinase pathways: coduplication of interacting proteins leads to new signaling cascades. *Journal of Molecular Evolutional*, 1999, 49(5): 567-582.
- [5] Martin-Blanco E. p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. *Bioessays*, 2000, 22(7): 637-645.
- [6] Nebreda AR, Porras A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochemical Sciences*, 2000, 25(6): 257-260.
- [7] Degols G, Shiozaki K, Russell P. Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology*, 1996, 16(6): 2870-2877.
- [8] Posas F, Chambers JR, Heyman JA, Hoeffler JP, de Nadal E, Ariño J. The transcriptional response of yeast to saline stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(23): 17249-17255.
- [9] Capaldi AP, Kaplan T, Liu Y, Habib N, Regev A, Friedman N, O' Shea EK. Structure and function of a transcriptional network activated by the MAPK Hog1. *Nature Genetics*, 2008, 40(11): 1300-1306.
- [10] Ni L, Bruce C, Hart C, Leigh-Bell J, Gelperin D, Umansky L, Gerstein MB, Snyder M. Dynamic and complex transcription factor binding during an inducible response in yeast. *Genes & Development*, 2009, 23(11): 1351-1363.
- [11] Miller C, Schwalb B, Maier K, Schulz D, Dümcke S, Zacher B, Mayer A, Sydow J, Marciniowski L, Dölken L, Martin DE, Tresch A, Cramer P. Dynamic transcriptome analysis measures rates of mRNA synthesis and decay in yeast. *Molecular Systems Biology*, 2011, 7: 458.
- [12] Saito H, Posas F. Response to hyperosmotic stress. *Genetics*, 2012, 192(2): 289-318.
- [13] Németh ZH, Deitch EA, Szabó C, Haskó G. Hyperosmotic stress induces nuclear factor-kappaB activation and interleukin-8 production in human intestinal epithelial cells. *American Journal of Pathology*, 2002, 161(3): 987-996.
- [14] Hao CM, Yull F, Blackwell T, Kömhoff M, Davis LS, Breyer MD. Dehydration activates an NF-kappaB-driven, COX2-dependent survival mechanism in renal medullary interstitial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 2000, 106(8): 973-982.
- [15] Caruccio L, Bae S, Liu AY, Chen KY. The heat-shock transcription factor HSF1 is rapidly activated by either hyper- or hypo-osmotic stress in mammalian cells. *Biochemical Journal*, 1997, 327 (Pt 2): 341-347.
- [16] Borsook D, Konradi C, Falkowski O, Comb M, Hyman SE. Molecular mechanisms of stress-induced proenkephalin gene regulation: CREB interacts with the proenkephalin gene in the mouse hypothalamus and is phosphorylated in response to hyperosmolar stress. *Molecular Endocrinology*, 1994, 8(2): 240-248.
- [17] Bode JG, Gatsios P, Ludwig S, Rapp UR, Häussinger D, Heinrich PC, Graeve L. The mitogen-activated protein (MAP) kinase p38 and its upstream activator MAP kinase kinase 6 are involved in the activation of signal transducer and activator of transcription by hyperosmolarity. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(42): 30222-30227.
- [18] Zhang Y, Lamm R, Pilonel C, Lam S, Xu JR. Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa* os-2 gene encodes a HOG1 mitogen-activated protein kinase homologue. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(2): 532-538.
- [19] Borkovich KA, Alex LA, Yarden O, Freitag M, Turner GE, Read ND, Seiler S, Bell-Pedersen D, Paietta J, Plesofsky N, Plamann M, Goodrich-Tanrikulu M, Schulte

U, Mannhaupt G, Nargang FE, Radford A, Selitrennikoff C, Galagan JE, Dunlap JC, Loros JJ, Catcheside D, Inoue H, Aramayo R, Polymenis M, Selker EU, Sachs MS, Marzluf GA, Paulsen I, Davis R, Ebbole DJ, Zelter A, Kalkman ER, O'Rourke R, Bowring F, Yeadon J, Ishii C, Suzuki K, Sakai W, Pratt R. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism.

Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004, 68 (1): 1-108.

- [20] Colot HV, Park G, Turner GE, Ringelberg C, Crew CM, Litvinkova L, Weiss RL, Borkovich KA, Dunlap JC. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(27): 10352-10357.

LAH-3, a transcriptional factor involved in osmotic regulation in *Neurospora crassa*

Wenshuang Gao[#], Zhijun Wang[#], Ying Wang^{*}

College of Biological Sciences, China Agricultural University, State Key Laboratory for Agrobiotechnology, Key Laboratory of Agro-Microbial Resource and Application, Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China

Abstract: [**Objective**] In order to identify the function of *lah-3* in osmotic regulation, we generated *lah-3* deletion strain and analyzed its phenotype by osmostress treatment. [**Methods**] We used homologous recombination to replace *lah-3* gene by *hph* gene and treated these cells with 4% NaCl and 1 M sorbitol to analyze the phenotype. Northern blot was used to detect the expressions of osmoresponding genes. Western blot was used to examine the phosphorylation level of LAH-3 and OS-2 and the expression of OS-2. [**Results**] In the deletion strain of transcription factor *lah-3* gene, the expressions of osmoresponding genes *gcy-1*, *stl-1* and *pck-1* were significantly reduced. Besides, the phosphorylation level of LAH-3 protein increased under the osmostress treatment. The phosphorylation of LAH-3 was not mediated by OS-2. The deletion of *lah-3* did not affect the *os-2* expression and the phosphorylation level of OS-2 upon osmostress. [**Conclusion**] LAH-3 involved in osmoresponding was independent of OS-2 MAPK pathway.

Keywords: *Neurospora crassa*, osmostress, OS-2 MAPK, transcription factor LAH-3

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (20110008110027) and by the Key Project of Chinese Ministry of Education (108015)

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*} Corresponding author. Tel: + 86-10-62731206; E-mail: wangying@cau.edu.cn

Received: 14 November 2013/Revised: 6 March 2014