



筛选抑制酿酒酵母生长的人类基因

王彩虹, 高晓冬, 中西秀树*

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:【目的】基于人类基因文库, 构建一个筛选抑制酿酒酵母生长的人类基因的方法, 并运用此方法筛选含有生长抑制性人源蛋白质的酿酒酵母, 用于分析人类基因的生理功能及其抑制剂的寻找。【方法】利用 Gateway™ 重组技术将人类蛋白质编码基因构建到酿酒酵母表达质粒中。得到的质粒分别转化酿酒酵母细胞中, 分析哪些基因的表达会抑制酿酒酵母的生长, 并用绿色荧光蛋白标签对典型候选基因在酿酒酵母中的定位进行观察。【结果与结论】本研究建立了抑制酿酒酵母生长的人类基因的筛选方法, 并运用此方法成功地从 2991 个人类蛋白质编码基因中筛选到 29 个显著抑制酿酒酵母生长的基因。其中一些是引起人类疾病的致病基因。例如, PDLIM4 参与到骨质疏松症和前列腺癌的形成和发展, 但其生理功能尚不清楚。我们的研究可能为揭示这些候选基因的功能和调节机制提供新的途径。

关键词: 筛选, 人类基因, 酿酒酵母, 抑制生长, 荧光定位

酿酒酵母作为最早完成全基因组测序的真核生物^[1], 其培养方式简单且基因操作容易, 是研究真核生物基因的调控表达、细胞周期、基础代谢和细胞凋亡等基本生物过程的理想模式生物^[2-3]。此外, 很多生物反应过程在人类和酿酒酵母中高度保守, 而且与人类疾病相关的基因在酿酒酵母中大多能找到同源基因^[4-6]; 这促使酿酒酵母成为研究人体细胞功能和疾病潜在机理的炙手可热的工具, 并常常用作高通量筛选平台用于治疗人类疾病的候选药物筛选以及药物靶点鉴定^[7]。

人和酵母在 10 亿年前有共同的祖先, 两物种

间部分代谢及其调控途径是保守的^[7]。经过了这十几亿年的趋向进化, 酿酒酵母因只保留了生长繁殖所必需的生物过程, 基因组只包括约 6000 个基因。人类除了这些与酿酒酵母相似的必需生物过程之外, 还有更为复杂的调节机制导致其基因组包括大约 20000 个蛋白质编码基因。因此, 以遗传背景简单的酿酒酵母为模型研究人类基因规避了冗杂的背景干扰。人类蛋白质在酿酒酵母中的异源过表达使酿酒酵母的内在生理机能被扰乱, 导致酿酒酵母有可测表型变化, 这是基于酿酒酵母为模式生物进行的科学研究的关键点。通过确

基金项目: 国家自然科学基金(21576118); 国家“111 计划”(111-2-06)

*通信作者。Tel: +86-510-85197003; E-mail: hideki@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2018-01-02; 修回日期: 2018-03-23; 网络出版日期: 2018-05-29

认人源基因在酿酒酵母中发挥作用抑制酿酒酵母生长的分子机制, 我们可利用生长缺陷酿酒酵母模型来揭示此类人类基因的功能甚至是筛选相关疾病的治疗药物和新靶点。例如在寻找人热休克蛋白调节因子 2 (human heat shock factor 2, hHSF2) 抑制药物的研究中^[8], 研究者发现在酿酒酵母中过表达 hHSF2 会导致酵母中分子伴侣蛋白表达水平的上调而强烈抑制酿酒酵母的生长, 但抑制 hHSF2 的活性能够回补酿酒酵母的生长缺陷; 由此, 作者以稳定表达了 hHSF2 的酿酒酵母为模型建立了可用于筛选抑制 hHSF2 活性药物的系统。另外, 在本实验室之前的研究中^[9]我们发现, 在酿酒酵母中过表达人的短型 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(sOGT)会引起酿酒酵母细胞内某些蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化并强烈抑制酿酒酵母的生长, 而再在此细胞内表达 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(OGA)后, 酿酒酵母细胞内因 sOGT 引起的某些蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化基本会被消除并且酿酒酵母的生长缺陷得以回补。这表明人的 O-GlcNAc 糖基化系统可以在并无 O-糖基化存在的酿酒酵母细胞中得以模拟, 这对于 OGT 的功能和调节机制的研究无疑提供了全新的途径。综上所述, 过表达人源基因会导致酿酒酵母生长缺陷这一特点适合进行人类基因功能组学和疾病相关研究。

为了广泛寻找上文所述的生长缺陷酿酒酵母模型, 本研究创立了批量筛选抑制酿酒酵母生长的人类基因的方法, 并运用此方法进行了筛选。得益于 Invitrogen™ Gateway™ 重组克隆技术的诞生^[10-11], 我们能够简单便捷地将庞大的人类基因 cDNA 文库克隆到酿酒酵母表达系统中。我们通过 Gateway™ 重组技术中 LR 重组反应, 将构建于入门载体上的人的单个蛋白编码基因插入到适用于酿酒酵母的表达载体上, 形成 pRS426-TEFpr-geneX 质粒库。再转入酿酒酵母细胞中, 寻找能够致使酿酒酵母生长受到抑制的人类基因, 并对典型候选基因在酿酒酵母细胞中的定位和功能作出了初步分析。本研究旨在为此类候选基因的相关研究工作者提供新的线索和研究途径。

1 材料和方法

1.1 菌株

本研究中所用的菌株详细信息见表 1。

1.2 主要试剂

本研究中所用的无氨基酸酵母氮源、必需氨基酸粉末以及脱脂奶粉等购于生工生物工程(上海)股份有限公司; DNA 连接酶、限制性内切酶购于宝生物工程有限公司(大连); Gateway® LR

表 1. 本研究使用的菌株

Table 1. List of strains used in this study

Strain	Genotype	Source
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AN120	<i>MATα /MATα ARG4 /arg4-NspI his3ΔSK /his3ΔSK ho: : LYS2 /ho: : LYS2 leu2 /leu2 lys2 /lys2 RME1 /rme1: : LEU2 trp1: : hisG /trp1: : hisGura3 /ura3</i>	[12]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPH499	<i>MATα, ade2-101, his3-Δ200, leu2-Δ1, trp1-Δ63, ura3Δ52</i>	Our laboratory
<i>Escherchia coli</i> T1-phage resistant	<i>F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galUgalKrrpsL (StrR) endA1 nupG λ-tonA</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>Escherchia coli</i> DH5α	<i>F⁻ φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>	Our laboratory

Clonase® II enzyme mix 试剂盒购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司; Anti-GFP Mouse mAb 一抗, Goat-Anti-Mouse IgG 二抗购于北京全式金生物技术有限公司; 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; 尿素等其他试剂购于国药集团。

1.3 培养基及培养条件

酿酒酵母和大肠杆菌分别在 30 °C 和 37 °C 培养, 各培养基配方如下。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母抽提物 5, 氯化钠 10, 琼脂粉 20 (固体培养基)。YPAD 培养基(g/L): 酵母抽提物 20, 蛋白胨 10, 腺嘌呤 0.03, 葡萄糖 20, 琼脂粉 20 (固体培养基)。

SD-Ura 培养基(g/L): 无氨基酸酵母氮源 6.7, 必需氨基酸混合粉末(不含尿氨酸) 2.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂粉 20.0 (固体培养基)。SG-Ura 培养

基(g/L): 无氨基酸酵母氮源 6.7, 必需氨基酸混合粉末(不含尿氨酸) 2.0, 半乳糖 20.0, 琼脂粉 20.0 (固体培养基)。

1.4 人的 cDNA 文库

人的 cDNA 文库 Ultimate™ ORF Clones, 购买于赛默飞世尔科技有限公司。此文库以 T1-Phage Resistant *E. coli* 为宿主菌, pENT221 为载体, 带有选择性标记 Kana, 目的基因阅读框两端构建有可用于 Gateway™ 重组技术进行高通量基因克隆的重组位点 *attL1* 和 *attL2*。通过培养文库宿主菌, 提取质粒 DNA, 可获得携带有人类基因开放阅读框的质粒 pENT221-geneX, 该质粒在 Gateway™ 重组技术中被称为入门载体(entry vector)。

1.5 质粒的构建

本研究所用到的质粒和引物详见表 2。通过 Gateway 重组技术将入门载体(pENT221-geneX

表 2. 本研究使用的质粒和引物

Table 2. List of plasmids and primers used in this study

Plasmid/Primer	Characteristic	Source
Plasmid		
pENT221-geneX entry vector	Kan ^r ; <i>attL1/2</i> recombination sites; ORF of human gene	Thermo Fisher Scientific
pRS426-TEFpr	<i>URA3</i> ; <i>TEF2</i> promoter	Our laboratory
pRS426-GALpr-GFP	<i>URA3</i> ; <i>GAL1</i> promoter; GFP tag (N terminal fusion)	This study
pRS426-GALpr	<i>URA3</i> ; <i>GAL1</i> promoter	This study
pRS426-TEFpr destination vector	<i>URA3</i> ; <i>TEF2</i> promoter; <i>attR1/2</i> recombination sites	Our laboratory
pRS426-GALpr-destination vector	<i>URA3</i> ; <i>GAL1</i> promoter; <i>attR1/2</i> recombination sites	This study
pRS426-GALpr-GFP destination Vector	<i>URA3</i> ; <i>GAL1</i> promoter; GFP tag (N terminal fusion); <i>attR1/2</i> recombination sites	This study
pRS426-TEFpr-geneX	<i>URA3</i> ; For expression of human gene X from <i>TEF2</i> promoter	This study
pRS426-GALpr-geneX	<i>URA3</i> ; For expression of human gene X from <i>GAL1</i> promoter	This study
pRS426-GALpr-GFP-geneX	<i>URA3</i> ; For expression of GFP-X from <i>GAL1</i> promoter	This study
Primer		
	Sequences (5'→3')	
Infusion GAL-F(RK1)	CGTCAAGGAGAAAAACTATACTAGTCCCATCACAAGTTTG	This study
Infusion GFP-F(RK2)	ACAAAGCTGGGGCTGGGGGATCCCCATCACAAGTTTGTA	This study
Infusion DC-R(RK3)	CATAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCGATAA	This study

entry vector)上携带的人类基因交换到 pRS426-TEFpr destination vector 上, 形成适用于酿酒酵母表达的 pRS426-TEFpr-geneX 质粒, 供本筛选实验使用。使用引物 RK1 和 RK3 从 pRS426-TEFpr destination vector 上扩增 *attR1-Cm^R-ccdB-attR2* 片段, 通过 *Spe* I 和 *Xho* I 酶切位点将片段插入到 pRS426-GALpr 质粒 得到 pRS426-GALpr-destination vector。使用引物 RK2 和 RK3 从 pRS426-TEFpr destination vector 上扩增 *attR1-Cm^R-ccdB-attR2* 片段, 通过同源臂重组互换将此片段融入到 pRS426-GALpr-GFP 质粒, 得到 pRS426-GALpr-GFP destination vector。如图 1 所示, 入门载体的 ORF 两端设计有 *attL1* 和 *attL2* 重组交换臂, 当构建的目的载体也携带有可用于 LR 重组反应的交换臂 *attR1* 和 *attR2* 时, 这两种质粒可在 Gateway[®] LR Clonase[®] II 酶的作用下发生 LR 重组反应, 将入门载体上的目的基因(ORF)交换到目的载体上。目的载体上引入的 *ccdB* 毒性基因, 可杀死负筛选克隆而有效地避免假阳性现象的发生。本研究通过构建 pRS426-GALpr-destination vector 和 pRS426-GALpr-GFP destination vector 这两个目的载体, 可以将候选基因在 Gateway 重组技术的帮助下整合到目的载体上形成 pRS426-GALpr-geneX 和 pRS426-GALpr-GFP-geneX 质粒, 以便于对目的基因产物

进行诱导表达和在酿酒酵母中的定位分析。

1.6 酿酒酵母的一步转化

接种经平板活化后的酿酒酵母适量于 5 mL YPAD 液体培养基中, 30 °C 温摇床过夜培养至 $OD_{660}=1.0$ 时, 离心收集菌体, 用无菌水洗涤 2 次。依次加入 100 μ L 一步转化液(0.2 mol/L LiAc, 0.1 mol/L 二硫苏糖醇, 40% PEG4000)和 1 μ L 待转化质粒(0.1 μ g/ μ L)充分振荡混匀。45 °C 金属浴热激 30 min 后涂布于相应的选择性培养基 30 °C 恒温培养箱培养 3 d。

1.7 筛选方法

筛选流程见图 2: 首先采用 96 孔板进行酿酒酵母表达质粒的批量转化, 将构建的 pRS426-TEFpr-geneX 质粒转入酿酒酵母菌株 AN120 中。随后, 待长出单菌落, 挑取单个转化子悬浮于 10 μ L 无菌水中并点滴于新鲜 SD-Ura 平板上, 30 °C 恒温培养箱培养 18 h, 通过观察菌斑颜色深浅来判断酵母营养生长是否受到抑制。

1.8 酿酒酵母生长的检测方法

平板划线法: 用无菌牙签蘸取带有候选基因的 pRS426-TEFpr-geneX 质粒酿酒酵母(AN120)转化子于相应固体培养基上划线稀释, 30 °C 恒温培养箱培养 2 d, 观察菌落生长情况。

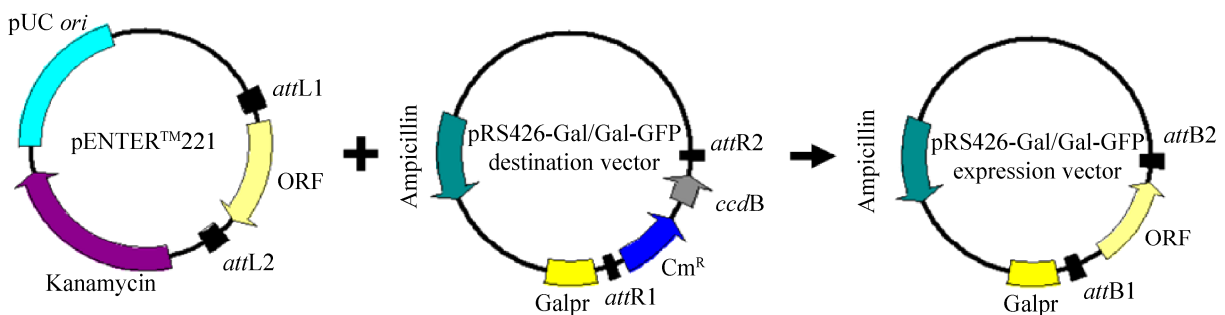


图 1. LR 重组反应示意图

Figure 1. Schematic diagram of LR recombination reaction.

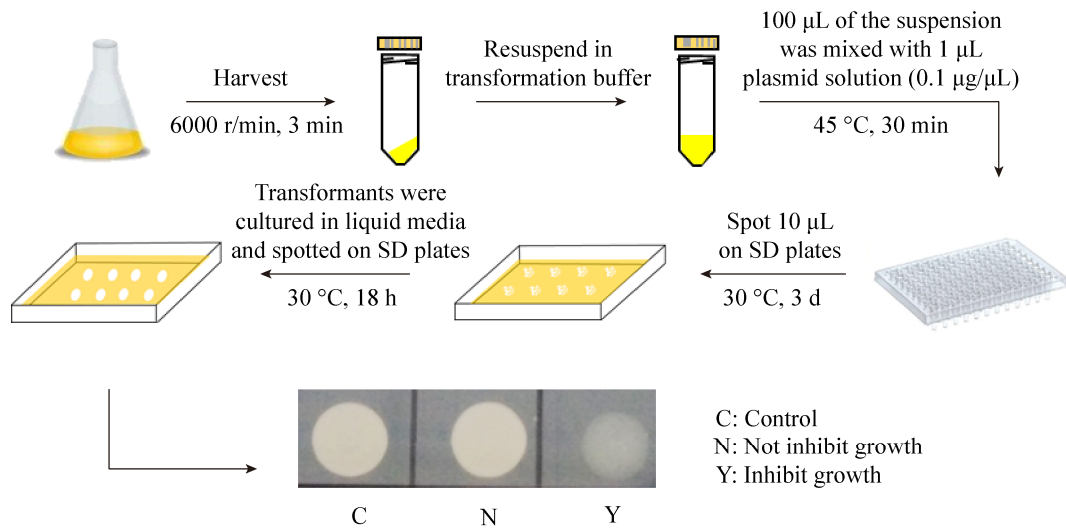


图 2. 抑制酿酒酵母营养生长的人类基因的筛选流程

Figure 2. Outline for screening of human genes that inhibit yeast growth.

梯度稀释点板法：接种酿酒酵母于葡萄糖为碳源的尿嘧啶缺陷液体培养基中，过夜培养至 $OD_{660}=1.0$ ，不同的样品调整到相同细胞浓度，起始浓度为 1×10^7 个/mL，10 倍梯度稀释细胞，连续稀释 4 个梯度。在候选基因复验试验中，每梯度取 5 μL 菌液，浓度由低到高，依次点于以葡萄糖为碳源的尿嘧啶缺陷平板上；在 *GAL* 启动子诱导目的蛋白表达考察其对酿酒酵母 YPH499 生长的影响实验中，每梯度取 8 μL 菌液分别点于葡萄糖和半乳糖为碳源的尿嘧啶缺陷平板上，30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱 2 d，观察菌落生长情况。

1.9 荧光显微镜观察

从平板上挑取含有 pRS426-*GALpr*-GFP-geneX(目的基因的 N 端融合了 GFP 荧光标签)质粒的 YPH499 菌株转化子，接种于 5 mL 的 SD-Ura 液体培养基中过夜培养，按 10% (V/V) 接种量转接至 SG-Ura 液体培养基中培养至 $OD_{660}=0.6-0.8$ 。离心收集细胞，用去离子水洗涤细胞 2-3 次，并用 150 μL 去离子水重悬细胞。取 5 μL 的菌液滴

于载玻片中央，盖上盖玻片，倒置于荧光显微镜上，观察目的基因绿色荧光融合蛋白 GFP-geneX 在酿酒酵母菌株 YPH499 中的表达和定位。图片拍摄使用软件 NIS-Element AR 进行，并使用 NIS-Elements Viewer 软件进行图像处理和分析。

1.10 酿酒酵母的全蛋白提取

接种酵母于 5 mL 的 SD-Ura 液体培养基中，30 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养至 $OD_{660}=1.0$ ，收集细胞转移至 5 mL 的 SG-Ura 液体培养基中，30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 8 h。收集菌体，无菌水洗涤细胞 2 次，加 8 mol/L 尿素缓冲溶液 150 μL 和 0.1 mol/L 蛋白酶抑制剂 PMSF 1.5 μL ，加玻璃珠振荡破碎细胞，15000 $\times g$ ，离心 10 min 取上清。此时上清即为酵母全蛋白粗提液，用 BCA 试剂盒测蛋白质浓度。

1.11 蛋白质免疫印迹

电泳：每个样品上样量为 40 μg (总蛋白质量) 进行 SDS-PAGE。浓缩胶：电压 80 V，30 min；分离胶：电压 120 V，60 min。转膜：采用半干式转膜法转膜，电压 25 V，电流 1.0 A，时间 30 min。

免疫印迹：5%的脱脂奶粉溶液封闭 2 h，用 5%的脱脂奶粉溶液按 1:5000 稀释比添加一抗，室温 1.5 h 或 4 °C 过夜孵育；二抗的稀释比同一抗，室温孵育 1 h。显色：ECL 显色液 A 和 B 混匀，涂于膜上，用 ImageQuant LAS4000 mini 显色。

2 结果和分析

2.1 抑制酿酒酵母生长的人类基因的筛选和复验

人的 cDNA 文库 Ultimate™ ORF Clones 商品共包含 17384 个基因，本研究已将其中 2991 个基因分别构建于酿酒酵母表达质粒 pRS426-TEFpr 上。基于本研究构建的 2991 个人类基因的表达质粒，我们根据制定的策略(图 2)对这 2991 个基因进行筛选，寻找能够抑制酿酒酵母菌株 AN120 细胞生长的候选基因。初次筛选结果(图 3)显示这 2991 个基因中有 181 个基因的表达产物会抑制酿酒酵母的生长。为了进一步验证筛选结果并且能够简单、直观地观察候选基因对酿酒酵母生长的抑制程度，本研究还采取了平板划线法来复

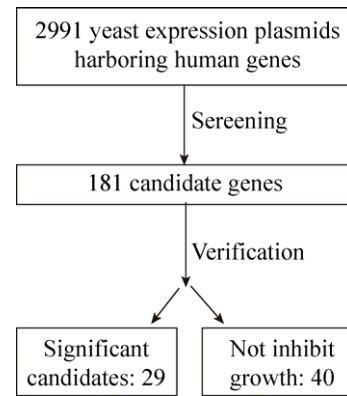


图 3. 抑制酿酒酵母生长的人类基因的筛选结果统计图
Figure 3. Summary of the screening of human genes that inhibit yeast growth.

验这 181 个基因的表达产物对酿酒酵母营养生长的影响。

复验结果表明，181 个初筛候选基因中，仅 40 个候选基因的表达产物对酿酒酵母生长的抑制现象微弱，由此可见本研究筛选方法的可靠性较高；有 29 个候选基因对酿酒酵母营养生长的抑制尤为显著(图 4)，这些显著抑制酿酒酵母生长的人类基因详细信息见表 3。

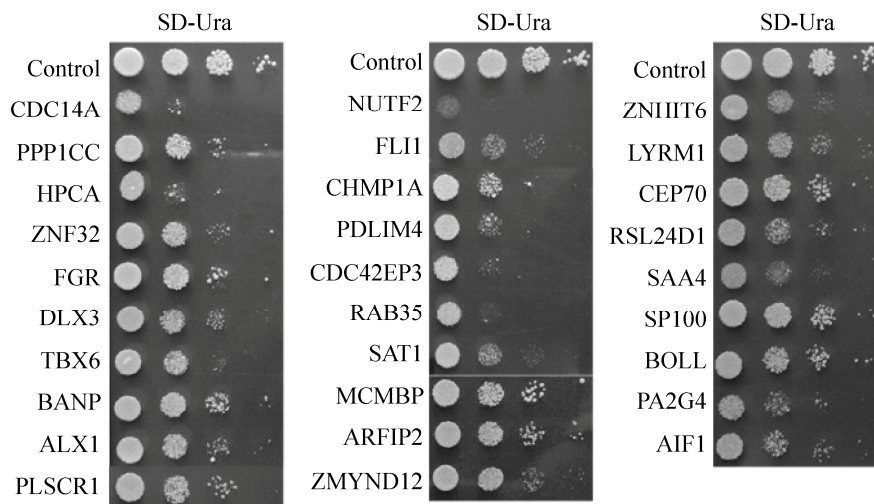


图 4. 表达显著候选基因对酿酒酵母营养生长的影响

Figure 4. Growth phenotype of yeast cells expression the candidate genes. Control, wild-type (AN120) cells harboring pRS426-TEFpr empty vector.

表 3. 显著抑制酿酒酵母生长的人类基因

Table 3. List of human genes that significantly inhibit the normal growth of yeast

Gene	Description of gene product	Process ^a
<i>SAA4</i>	Serum amyloid A4, constitutive	Cell chemotaxis
<i>PPP1CC</i>	Protein phosphatase 1 catalytic subunit gamma	Cell cycle
<i>PA2G4</i>	Proliferation-associated 2G4	Cell cycle arrest
<i>MCMBP</i>	Minichromosome maintenance complex binding protein	DNA replication
<i>RAB35</i>	Member RAS oncogene family	Membrane trafficking
<i>BOLL</i>	Boule homolog, RNA binding protein	Meiotic cell cycle
<i>CDC14A</i>	Cell division cycle 14A	Mitotic cell cycle
<i>CEP70</i>	Centrosomal protein 70	Mitotic cell cycle
<i>SAT1</i>	Spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1	polyamine metabolism
<i>NUTF2</i>	Nuclear transport factor 2	Protein import into nucleus
<i>RSL24D1</i>	Ribosomal L24 domain containing 1	Ribosome biogenesis
<i>ZNHIT6</i>	Zinc finger HIT-type containing 6	Ribosome biogenesis
<i>AIF1</i>	Allograft inflammatory factor 1	Signalling
<i>HPCA</i>	Hippocalcin, neuron-specific calcium-binding protein	Signalling
<i>PLSCR1</i>	Phospholipid scramblase 1	Signalling
<i>FGR</i>	Src family tyrosine kinase	Signalling
<i>ARFIP2</i>	ADP ribosylation factor interacting protein 2	Signalling
<i>CDC42EP3</i>	CDC42 effector protein 3	Signalling
<i>SP100</i>	SP100 nuclear antigen	Signalling
<i>DLX3</i>	Distal-less homeobox 3	Transcription
<i>ALX1</i>	ALX homeobox 1	Transcription
<i>BANP</i>	BTG3 associated nuclear protein	Transcription
<i>FLI1</i>	Fli-1 proto-oncogene, ETS transcription factor	Transcription
<i>TBX6</i>	Transcription factor T-box 6	Transcription
<i>ZNF32</i>	Zinc finger protein 32	Transcription
<i>LYRM1</i>	LYR motif-containing protein 1	Unknown
<i>PDLIM4</i>	PDZ and LIM domain 4	Unknown
<i>ZMYND12</i>	Zinc finger MYND-type containing 12	Unknown
<i>CHMP1A</i>	Charged multivesicular body protein 1A	Vesicle-mediated transport

^a Representative biological process that the indicated gene product is involved according to GO term.

2.2 抑制酿酒酵母生长的人类基因的生物学信息

为了探究这 29 个候选基因显著抑制酿酒酵母生长的原因，我们首先通过基因本体论 (gene ontology, GO)，从理论上分析基因参与到的细胞生物学途径，并根据这 29 个候选基因的代表性生物过程 (表 3) 对其进行分组，可大致分为参与到细

胞内信号传导机制、基因的转录及翻译、细胞周期、细胞内大分子转运和物质代谢这五类生物过程。分组结果显示，大部分候选基因与细胞内信号传导机制 (27.5%，8/29)，基因的转录及翻译 (27.5%，8/29) 和细胞周期 (20.6%，6/29) 相关；还有少部分候选基因与细胞内大分子转运 (3/29) 和

物质代谢(1/29)相关;有意思的是,这些候选基因中 *LYRM1*、*ZMYND12* 和 *PDLIM4* 这 3 个基因参与的生物过程尚不明确。

2.3 抑制酿酒酵母生长的人类基因在酿酒酵母中的定位观察和功能分析

使用绿色荧光蛋白来报告目的基因的表达产物在细胞中的定位能够为我们研究该基因的功能提供宝贵的线索^[13-14];不仅如此,我们还可以通过荧光观察目的基因是否在宿主菌种有表达^[15-16],这比使用蛋白质免疫印记来检测目的蛋白是否在宿主菌中表达的方法简单、快速、易操作。在表 3 中我们列出了候选基因在细胞中参与的代表性生物过程,前文中也基于这些生物过程对 29 个候选基因进行了分组。因此,我们从各组中选取了一些基因作为代表来研究他们在酿酒酵母中的定位,共选取了 8 个代表基因。为了研究这些候选基因在酿酒酵母细胞中的表达和定位,我们构建了带有绿色荧光蛋白(GFP)标签的目的载体

pRS426-GALpr-GFP destination vector。如前文中所述,我们通过 Gateway 重组技术将待研究目的基因交换到目的载体上,构建出 N 端融合了 GFP 的目的基因表达质粒 pRS426-GALpr-GFP-geneX。*GALI* 启动子的引入是为了调控目的蛋白的表达,有利于更好地观测到绿色荧光融合蛋白在酿酒酵母细胞中的定位。本实验室保藏的酿酒酵母 AN120 菌株 *GAL4* 基因可能存在突变,导致带有 *GALI* 启动子的质粒在该菌株中不能正常启动目的蛋白表达。因此,我们改换酿酒酵母菌株 YPH499 为宿主菌。

不同启动子的调控表达水平不同^[17-18],而外源基因的表达水平差异对细胞的影响程度也不同。因此在进行荧光观察前,我们首先考查了 *GALI* 启动子诱导下候选基因的表达对酿酒酵母生长的抑制情况,结果表明,在诱导型启动子 *GALI* 的调控表达下,*HPCA* 基因不再抑制酿酒酵母的生长(图 5-A),而在筛选实验中组成型启动子

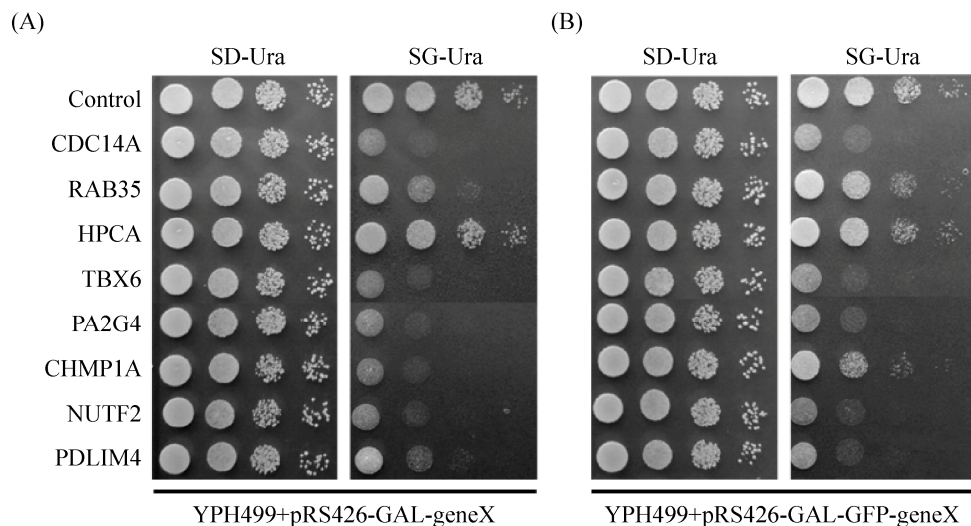


图 5. 表达 N 端融合绿色荧光蛋白的候选基因对 YPH499 细胞生长的影响

Figure 5. Growth phenotype caused by expression of the indicated gene fused to GFP in yeast cells. A: wild-type (YPH99) cells were transformed with pRS426-GAL harboring the indicated genes; B: wild-type (YPH99) cells were transformed with pRS426-GAL harboring the indicated genes fused to GFP. The transformants were spotted on plates either supplemented with glucose (SD) or galactose (SG). Control, the cells harboring pRS426-GAL empty plasmid.

TEF2 的调控下, *HPCA* 基因的表达却造成了酿酒酵母显著的生长缺陷(图 4)。这可能是由于 *GAL1* 启动子调控的 *HPCA* 表达水平要比 *TEF2* 启动子低, 表达量未达到抑制酿酒酵母生长的水平。除 *HPCA* 外, 其他 7 个代表性候选基因对酿酒酵母生长的抑制作用没有受到更换启动子的影响。随后我们还考察了候选基因对酿酒酵母生长的抑制作用是否受到其 N 端融合表达的 GFP 标签的影响(图 5-B), 实验结果显示, 除 *RAB35* 和 *CHMP1A* 的 N 端融合了 GFP 后会减弱其对 YPH499 细胞生长的抑制作用以外, N 端融合表达 GFP 对其他 5 个代表性候选基因的功能并不造成影响。

荧光观察结果显示, 在 8 个代表性候选基因表达的酿酒酵母中都能够观察到绿色荧光信号(图 6), 表明这些基因在酿酒酵母 YPH499 中均有表达。*CDC14A*、*RAB35*、*TBX6*、*CHMP1A*、*NUTF2* 和 *PDLIM4* 的 N 端 GFP 融合表达产物在 YPH499 细胞中呈现点状或环状, 这表明他们可能在酿酒酵母亚细胞器中有特定定位。*TBX6* 为人体细胞转录因子中的一员, 定位于细胞核^[19-20], GFP-*TBX6* 的绿色荧光信号聚集于 YPH499 细胞芽颈部(图 6-A-g-i), 我们推测该基因产物在酿酒酵母中也定位于细胞核。*CHMP1A* 与细胞内的膜泡运输相关^[21-22], 与 GFP-*TBX6* 相似, GFP-*CHMP1A* 在酿酒酵母的细胞质中没有分布(图 6-A-j-l), 仅定位于某些特定的亚细胞器中。*NUTF2* 为胞液蛋白, 作为受体调节蛋白质的对核运输^[23], 它的 GFP 融合蛋白在 YPH499 中的荧光信号分布于细胞质中并且有环状聚集(图 6-A-m-o), 我们推测该环状聚集荧光信号可能是 *NUTF2* 在参与核物质运输过程中定位于核膜和核质形成的。类似于 GFP-*NUTF2* 在酿酒酵母中的荧光定位信号,

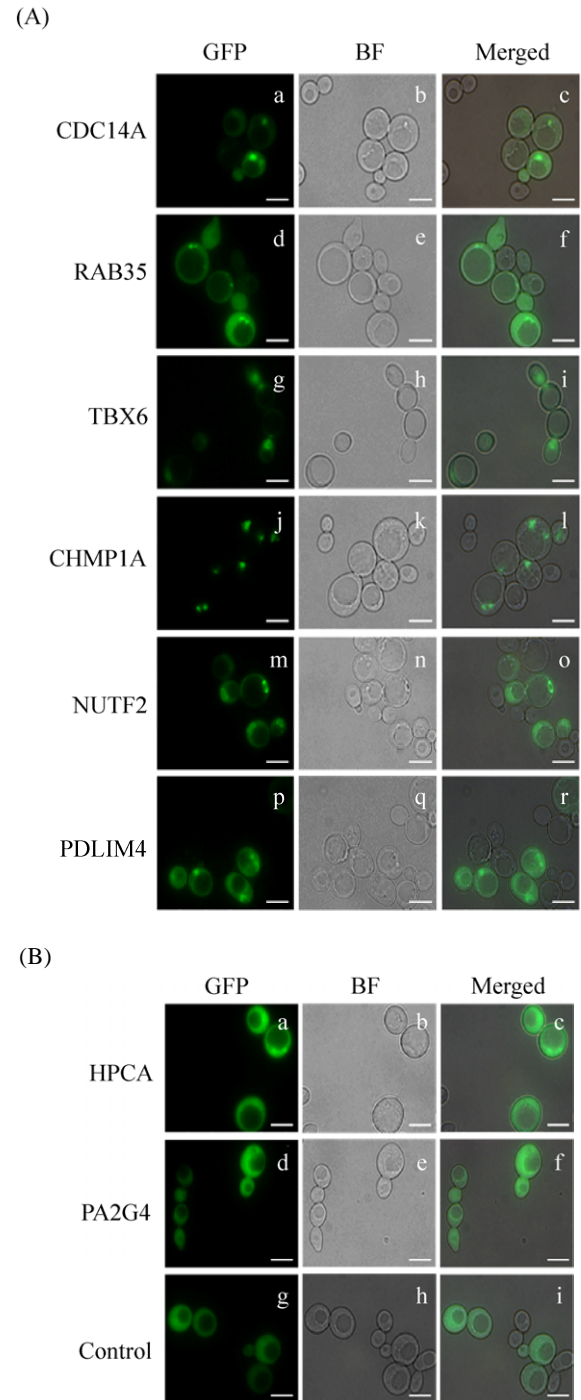


图 6. N 端融合了绿色荧光蛋白的候选基因(GFP-GeneX)在酿酒酵母 YPH499 中的定位

Figure 6. Localization of GFP-geneX fusions in YPH499 cells. A: GFP fusions which are localized to particular compartment in yeast cells; B: GFP fusions which are localized to the cytosol in yeast cells. Scale bar, 5 μm .

GFP-CDC14A、GFP-RAB35 和 GFP-PDLIM4 也在细胞质中呈液态分布并且有强点状、类圆形荧光信号聚集, 这表明他们不仅在细胞质中有可溶分布, 也可能定位于酿酒酵母中细胞核、内体、运输小泡等特定细胞器, 印证了这些基因抑制酿酒酵母生长是由于其在酿酒酵母细胞中发挥了某些生物学功能。

不同于上述 6 个代表性基因表达产物在酵母细胞器中有特定定位, *HPCA* 和 *PA2G4* 表达产物呈现出与对照组(以酿酒酵母 YPH499 中单独表达了 GFP 为对照组, 如图 6-B 中 Control 所示, GFP 广泛分布于细胞液中)相同的绿色荧光信号分布(图 6-B)。我们通过蛋白质免疫印记(图 7)确定它们的绿色荧光信号来源于 GFP-*HPCA* 和 GFP-*PA2G4*, 这个结果表明 *HPCA* 和 *PA2G4* 在酿酒酵母中的表达产物呈液态可溶性分布于细胞质中。有研究表明 *HPCA* 在人神经细胞中广泛表达且定位于细胞质和细胞膜上^[24], *PA2G4* 在人体细胞中的表达产物分布于细胞质中^[25], 这也与我们在酿酒酵母中对他们的表达产物进行荧光定位观察的结果一致。

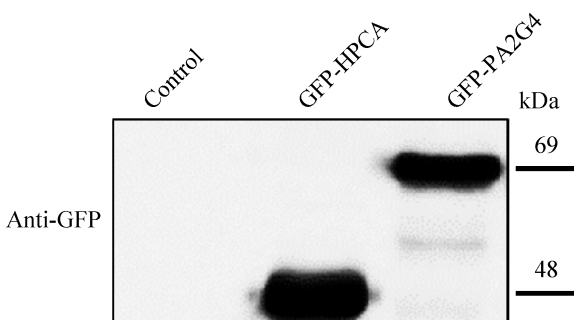


图 7. *HPCA* 和 *PA2G4* N 端绿色荧光融合蛋白在 YPH499 中的表达

Figure 7. GFP fusions to *HPCA* and *PA2G4* expressed in YPH499 cells.

3 讨论

人类生物学的直接探究往往受到现实和伦理上的约束, 故而酿酒酵母作为与人体细胞组成有更大相似性的真核生物成为研究人类生物学的重要工具, 尤其是生长缺陷酿酒酵母模型。但并非所有的人源蛋白在酿酒酵母中的过表达都会导致酿酒酵母生长缺陷, 因此, 寻找此类酿酒酵母模型对人类基因功能和疾病关键基因相关调节因子的发现以及疾病靶点药物筛选等研究意义重大。本研究建立了批量筛选抑制酿酒酵母生长的人类基因的方法, 并成功地运用此方法从 2991 个人类蛋白质编码基因中筛选到 29 个显著抑制酿酒酵母生长的基因。这些抑制酿酒酵母生长的人类基因涉及到细胞内信号传导、基因的转录及翻译、细胞周期、细胞内大分子转运和物质代谢等生物过程。而这些生物过程中一些基本的细胞活动在酿酒酵母和人是高度保守的, 例如细胞周期的进行以及 DNA 的复制^[26-27], 这也解释了为何我们筛选到的候选基因大多与细胞周期的调控相关, 更表明在酿酒酵母中研究此类人类基因功能的可靠性。

在对代表性候选基因进行荧光观察的实验中我们发现, 这些基因的表达产物在酿酒酵母细胞中的定位基本与已报道的在人体细胞中的典型定位一致, 这意味着这些基因极有可能在酿酒酵母细胞中发挥着它们在人体细胞中相同生物学功能从而影响了酿酒酵母的生长。例如, 据报道 *PA2G4* 对细胞的增殖和分化抑制强烈^[28], 这也解释了为何它在酿酒酵母中的过表达会强烈抑制酿酒酵母的生长; 但是, 就 *HPCA* 已被报道的功能来看, 我们还不能推测它抑制酿酒酵母生长的原因。*HPCA* 作为神经元感应蛋白, 它的表达异常与肌

张力障碍相关^[24]，我们的发现可以应用于 HPCA 相关调节基因的发现以及以 HPCA 为靶标的药物筛选。

值得关注的是，候选基因中 *LYRMI*、*ZMYND12* 和 *PDLIM4* 这 3 个基因的生物学功能尚不清楚甚至是未知的。*ZMYND12* 是新发现的人类蛋白质编码基因，具体功能未知；*LYRMI* 基因在脂肪组织和肥胖个体中有较高的表达水平^[29]，可能有促进细胞增殖和抑制细胞凋亡的作用，但具体功能和调节机制还不清楚；*PDLIM4* 编码的蛋白可能参与到骨骼发育过程，是骨质疏松症致病基因，也有研究发现在前列腺癌细胞中该基因的启动子区域被甲基化而沉默表达^[30]，但 *PDLIM4* 的分子功能和作用机制仍不明确。我们对于这些基因抑制酿酒酵母生长的发现将为揭示这些基因的生物学功能和关系网提供新的研究途径。总之，本研究建立的筛选抑制酿酒酵母生长的人类基因的方法可为以后基于人类基因组的筛选提供参考和依据，也为本文中提及的候选基因的功能和相关调节机制的研究提供了新的线索。

参 考 文 献

- [1] Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. Life with 6000 genes. *Science*, 1996, 274(5287): 546–567.
- [2] Karathia H, Vilaprinyo E, Sorribas A, Alves R. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16015.
- [3] Botstein D, Fink GR. Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics*, 2011, 189(3): 695–704.
- [4] Foury F. Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene*, 1997, 195(1): 1–10.
- [5] Winderickx J, Delay C, de vos A, Klinger H, Pellens K, Vanhelmont T, van Leuven F, Zabrocki P. Protein folding diseases and neurodegeneration: lessons learned from yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2008, 1783(7): 1381–1395.
- [6] Kryndushkin D, Shewmaker F. Modeling ALS and FTL D proteinopathies in yeast: An efficient approach for studying protein aggregation and toxicity. *Prion*, 2011, 5(4): 250–257.
- [7] Laurent JM, Young JH, Kachroo AH, Marcotte EM. Efforts to make and apply humanized yeast. *Briefings in Functional Genomics*, 2016, 15(2): 155–163.
- [8] Smith LM, Bhattacharya D, Williams DJ, Dixon I, Powell NR, Erkina TY, Erkine AM. High-throughput screening system for inhibitors of human Heat Shock Factor 2. *Cell Stress and Chaperones*, 2015, 20(5): 833–841.
- [9] Nakanishi H, Li F, Han BX, Arai S, Gao XD. Yeast cells as an assay system for *in vivo* O-GlcNAc modification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2017, 1861(5): 1159–1167.
- [10] Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Research*, 2000, 10(11): 1788–1795.
- [11] Traore SM, Zhao B. A novel Gateway®-compatible binary vector allows direct selection of recombinant clones in *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Methods*, 2011, 7(1): 42.
- [12] Lynn RR, Magee PT. Development of the spore wall during ascospore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, 1970, 44(3): 688–692.
- [13] Lorenz H, Hailey DW, Lippincott-Schwartz J. Fluorescence protease protection of GFP chimeras to reveal protein topology and subcellular localization. *Nature Methods*, 2006, 3(3): 205–210.
- [14] Meng XC, Liu GF, Liu Y, Bao Y, Cao XS. Universal expression vector with GFP label protein was used to study protein localization in plant cell. *Chinese Journal of Biochemical and Pharmaceutics*, 2016, 36(5): 28–31. (in Chinese)
孟祥潮, 刘国富, 刘营, 鲍岳, 曹雪松. 通用型植物 GFP 标签蛋白表达载体的构建和蛋白质的细胞内定位研究. *中国生化药物杂志*, 2016, 36(5): 28–31.
- [15] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, 263(5148): 802–805.

- [16] Piston DW. Use of the green fluorescent protein (GFP) as a marker for gene expression and protein function. *Biology of Reproduction*, 1998, 58: 18.
- [17] Wang ZF, Wang ZB, Li LN, An JM, Wang W, Cheng KD, Kong JQ. Construction and preliminary applications of a *Saccharomyces cerevisiae* detection plasmid using for screening promoter elements. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2013, 48(2): 228–235. (in Chinese)
王志芳, 王志标, 李丽娜, 安建梅, 王伟, 程克棣, 孔建强. 一种用于筛选启动子元件库的酵母检测载体的构建及初步应用. *药学学报*, 2013, 48(2): 228–235.
- [18] Alper H, Fischer C, Nevoigt E, Stephanopoulos G. Tuning genetic control through promoter engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(36): 12678–12683.
- [19] Tewes AC, Rall KK, Römer T, Hucke J, Kapczuk K, Brucker S, Wieacker P, Ledig S. Variations in *RBM8A* and *TBX6* are associated with disorders of the müllerian ducts. *Fertility and Sterility*, 2015, 103(5): 1313–1318.
- [20] Demay F, Bilican B, Rodriguez M, Carreira S, Pontecorvi M, Ling Y, Goding CR. T-box factors: targeting to chromatin and interaction with the histone H3 N-terminal tail. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2010, 20(4): 279–287.
- [21] Tsang HTH, Connell JW, Brown SE, Thompson A, Reid E, Sanderson CM. A systematic analysis of human CHMP protein interactions: additional MIT domain-containing proteins bind to multiple components of the human ESCRT III complex. *Genomics*, 2006, 88(3): 333–346.
- [22] Lata S, Schoehn G, Solomons J, Pires R, Göttlinger HG, Weissenhorn W. Structure and function of ESCRT-III. *Biochemical Society Transactions*, 2009, 37(1): 156–160.
- [23] Chafe SC, Pierce JB, Mangroo D. Nuclear-cytoplasmic trafficking of NTF2, the nuclear import receptor for the RanGTPase, is subjected to regulation. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42501.
- [24] Helassa N, Antonyuk SV, Lian LY, Haynes LP, Burgoyne RD. Biophysical and functional characterization of hippocalcin mutants responsible for human dystonia. *Human Molecular Genetics*, 2017, 26(13): 2426–2435.
- [25] Liu ZX, Ahn JY, Liu X, Ye KQ. Ebp1 isoforms distinctively regulate cell survival and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(29): 10917–10922.
- [26] Williamson DH. The timing of deoxyribonucleic acid synthesis in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, 1965, 25(3): 517–528.
- [27] Nasmyth KA, Reed SI. Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1980, 77(4): 2119–2123.
- [28] Zhang YX, Hamburger AW. Heregulin regulates the ability of the ErbB3-binding protein Ebp1 to bind E2F promoter elements and repress E2F-mediated transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(25): 26126–26133.
- [29] Zhang M, Zhao HM, Qin ZY, Qin R, Chen XH, Zhao YP, Zhang CM, Gao CL, Zhu C, Ji CB, Gao XG, Guo XR. Regulation of *LYRMI* gene expression by free fatty acids, adipokines, and rosiglitazone in 3T3-L1 adipocytes. *Experimental Diabetes Research*, 2011, 2012: 820989.
- [30] Vanaja DK, Ballman KV, Morlan BW, Cheville JC, Neumann RM, Lieber MM, Tindall DJ, Young CY. PDLIM4 repression by hypermethylation as a potential biomarker for prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 2006, 12(4): 1128–1136.

Screening of human genes that inhibit vegetative growth of budding yeast

Caihong Wang, Xiaodong Gao, Nakanishi Hideki*

Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] Heterologous expression of some human genes in yeast cells leads a severe growth defect. This phenomenon can occur when intrinsic yeast regulatory mechanisms are perturbed by the physiological function of the ectopically expressed human protein. Yeast cells are amenable to genetic studies and used as a platform for high-throughput screening. Thus, yeast cells harboring such growth inhibitory human proteins may be useful to analyze physiological function of the human protein and applied to find its inhibitor. In the present study, we constructed a collection of yeast expression plasmid harboring human protein-coding genes. Using the human gene library, we established a screening system to identify genes whose expression cause a growth defect in yeast cells. [Methods] Using the Gateway recombination technology, human protein-coding genes were cloned into a yeast expression plasmid. The resulting plasmids were individually transformed into yeast cells and analyzed whether their expression effects on yeast growth. Furthermore, identified inhibitory genes were expressed as GFP fusion proteins and their localization in yeast cells were analyzed. [Results and Conclusion] Among 2991 human protein-coding genes, we identified 29 genes whose expression caused a sever growth defect in yeast cells. Some of them are causative genes to develop human disorders. For example, *PDLIM4* is involved in development of osteoporosis and prostate cancer. Physiological function of *PDLIM4* has not been understand very well. Our study may provide another option to investigate human proteins.

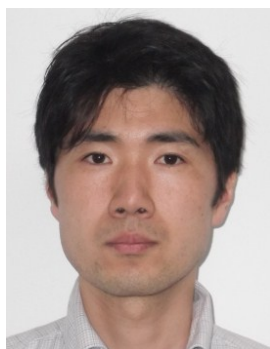
Keywords: screening, human genes, *Saccharomyces cerevisiae*, growth defect, localization

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21576118) and by the Program of Introducing Talents of Discipline to Universities (111-2-06)

*Corresponding author. Tel: +86-510-85197003; E-mail: hideki@jiangnan.edu.cn

Received: 2 January 2018; Revised: 23 March 2018; Published online: 29 May 2018



中西秀树, 教授, 2001年获日本东京农工大学博士学位。曾担任美国纽约州立大学博士后、副教授, 日本国立产业合研究所(AIST)糖锁研究中心助理研究员及日本福岛县立医科大学助理教授。2011年作为博士研究生导师赴任江南大学生物工程学院。10多年来中西教授一直以酵母细胞为研究对象, 主要从事分子生物学、糖生物学、细胞遗传学及微生物膜运输途径等领域的研究, 同时也正在为疾病相关基因及治疗药物的筛选构建良好的高通量筛选体系, 相关研究成果已经发表在 *Yeast*、*Applied and Environmental Microbiology*、*Journal of Cell Science*、*Molecular Biology of the Cell* 等期刊上。由于其在酿酒酵母孢子囊泡融合机理研究领域取得重大进展, 2013年被评为江苏省“创新团队计划”成员以及“双创计划”引进人才。