

## 甾醇 C-24 甲基转移酶和甾醇 C-8 异构酶在酿酒酵母麦角甾醇生物合成中的调控作用

张振颖<sup>1,2</sup>, 何秀萍<sup>1\*</sup>, 李巍巍<sup>1,2</sup>, 卢莹<sup>1</sup>, 王肇悦<sup>1</sup>, 张博润<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

(<sup>2</sup>中国科学院研究生院, 北京 100101)

**摘要** 【目的】研究 *ERG6* 基因编码的甾醇 C-24 甲基转移酶和 *ERG2* 基因编码的甾醇 C-8 异构酶在酿酒酵母麦角甾醇生物合成代谢中的调控作用。【方法】通过 PCR 扩增克隆到酿酒酵母甾醇 C-8 异构酶的编码序列及其终止子序列, 以大肠杆菌-酿酒酵母穿梭质粒 YEp352 为载体, 以磷酸甘油酸激酶基因 *PGK1* 启动子为上游调控元件构建了酵母菌表达质粒 pPERG2; 同时, 在本实验室已构建的 *ERG6* 表达质粒 pPERG6 的基础上, 构建了 *ERG2* 和 *ERG6* 共表达的重组质粒 pPERG6-2。将表达质粒转化酿酒酵母单倍体菌株 YS58, 依据营养缺陷互补筛选到重组菌株 YS58(pPERG2) 和 YS58(pPERG6-2)。通过紫外分光光度法和气相色谱法分析重组菌株甾醇组分和含量。【结果】在 *ERG6* 高表达的重组酵母菌中, 甾醇中间体和终产物麦角甾醇的含量均比对照菌高; 而在 *ERG2* 高表达的酵母菌株中, 无论甾醇中间体, 还是麦角甾醇的含量均明显降低。*ERG6* 和 *ERG2* 共表达重组菌株 YS58(pPERG6-2) 的麦角甾醇含量是对照菌株 YS58(YEp352) 的 1.41 倍, 是 *ERG2* 单独高表达菌株 YS58(pPERG2) 的 1.2 倍, 是 *ERG6* 单独高表达菌株 YS58(pPERG6) 的 1.12 倍。【结论】本研究首次证明甾醇 C-24 甲基转移酶催化的反应是酿酒酵母麦角甾醇合成代谢途径中的一个重要的限速步骤, 该酶活性提高不但补偿了 *ERG2* 高表达对甾醇合成的负效应, 而且使麦角甾醇含量进一步提高, 为构建麦角甾醇高产酵母工程菌株提供了实验依据。

**关键词:** 甾醇 C-24 甲基转移酶; 甾醇 C-8 异构酶; 共表达; 麦角甾醇; 酿酒酵母

**中图分类号:** Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)08-1063-06

麦角甾醇是真菌细胞各种膜的重要组成成分, 在细胞内参与调节膜的流动性、渗透性及膜结合蛋白的功能<sup>[1]</sup>。麦角甾醇也是维生素 D<sub>2</sub> 的重要前体和某些临床用固醇类激素的重要医药化工原料。此外, 有文献报道维生素 D 及甾醇类药物具有预防和治疗多种癌症的功效, 还可以预防心脏病、高血压、精神分裂症等<sup>[2]</sup>。因此, 麦角甾醇具有重要的经济价值。

酵母菌是生产麦角甾醇的主要菌种, 酿酒酵母是研究真核生物麦角甾醇合成代谢的理想模式菌株。酿酒酵母中麦角甾醇的生物合成包括甲羟戊酸途径和甾醇分支途径两个部分, 至少有 23 步反应, 涉及到 25 个结构基因(图 1)<sup>[1]</sup>。在如此复杂的代谢途径中, 可能存在多位点的限速步骤, 发现和改造这些限速反应对于优化麦角甾醇生物合成具有重要的意义。HMG-CoA 还原酶催化的反应是甾醇生物合

基金项目: 国家自然科学基金(30470035)

\* 通信作者。Tel: +86-10-64807356; Fax: +86-10-64807427; E-mail: hexp@im.ac.cn

作者简介: 张振颖(1981-), 女, 山西太原人, 硕士研究生, 主要从事酵母菌分子遗传与育种研究。E-mail: zhangzy81@gmail.com

收稿日期: 2009-04-02; 修回日期: 2009-04-23

成途径中第一个报道的限速步骤,高表达 HMG-CoA 还原酶可以促进中间体角鲨烯的积累,但对其它甾醇组分的含量影响很小<sup>[3]</sup>。近年来的研究发现 *ERG11* 编码的羊毛甾醇 C-14 脱甲基酶、*ERG27* 编码的甾醇 C-3 酮基还原酶、*ERG3* 编码的甾醇 C-5 去饱和酶、*ERG4* 编码的甾醇 C-24 还原酶、以及 *ARE2* 编码的甾醇酰基转移酶等都可能是甾醇合成途径中的限速酶<sup>[4-7]</sup>。*ERG6* 基因编码的甾醇 C-24 甲基转移酶和 *ERG2* 基因编码的甾醇 C-8 异构酶催化麦角甾醇合成途径中两个连续的反应,其中甾醇 C-24 甲基转移酶催化来自 S-腺苷甲硫氨酸的甲基以亚甲基

的形式连接到酵母甾醇(zymosterol)侧链的 C-24 位,形成粪甾醇(fecosterol)。本实验室前期研究发现 *ERG6* 基因高表达使酵母细胞麦角甾醇含量提高,预示着甾醇 C-24 甲基转移酶在甾醇合成中的重要调控作用<sup>[8]</sup>。本研究通过构建 *ERG6* 和 *ERG2* 高表达和共表达酵母菌株,分析不同菌株中甾醇组分和含量的变化特点,确定 *ERG6* 和 *ERG2* 在麦角甾醇合成代谢中的调控作用,为全面阐述甾醇化合物生物合成的调控机制和麦角甾醇的代谢优化提供重要的理论依据。

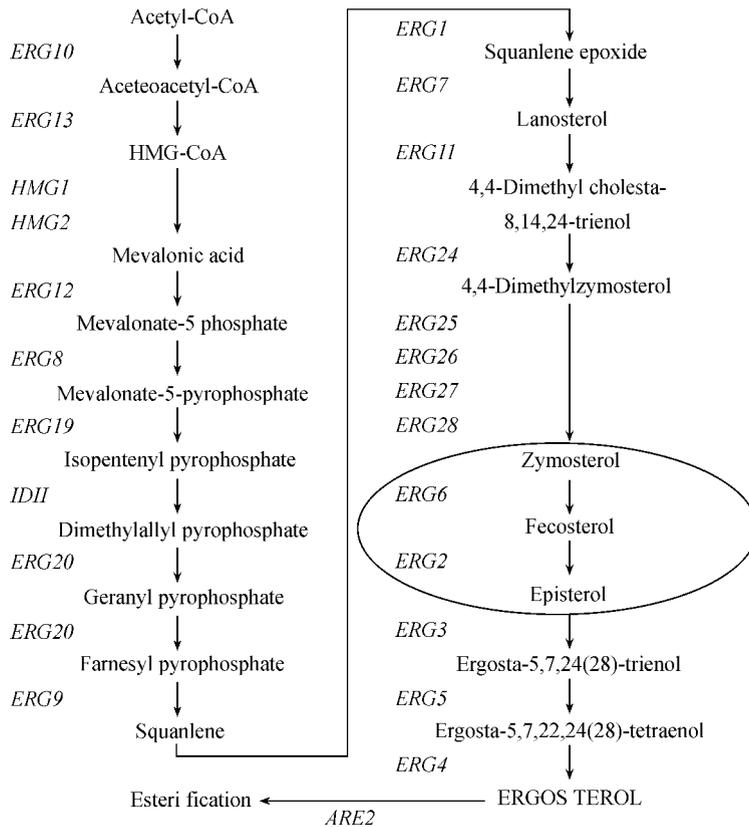


图 1 酵母菌麦角甾醇生物合成途径及其相关基因

Fig.1 The pathway of ergosterol biosynthesis in yeast.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒**:大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  [*supE44*  $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*],酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)YS58 (*MAT $\alpha$*  *leu2-3,112* *his4-519* *trp1-789* *ura3-52*)<sup>[9]</sup>,酿酒酵母(*S. cerevisiae*)YE39均由本实验室保存。本实验所用质粒见表1。

**1.1.2 培养基和培养条件**:大肠杆菌 DH5 $\alpha$  保存和

培养用 LB 培养基,筛选大肠杆菌转化子用含有 50  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基<sup>[13]</sup>。酵母菌保存和培养用 YEPD 培养基,酵母重组菌株筛选用含有色氨酸、亮氨酸和组氨酸的基本培养基 SC<sup>[14]</sup>。

**1.1.3 酶和试剂**:实验所用限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 *Pfu* Mix 产品均为宝生物工程(大连)有限公司,麦角甾醇购于 Sigma 公司,溶菌酶、RNase 和氨苄青霉素购自华美生物工程有限公司,岛津 2010 气相色谱仪购于日本岛津公司。

表 1 实验所用质粒

Table 1 Plasmids used in this study

Plasmids	Description	Reference
pERG2	recombined plasmid , <i>URA3</i> , <i>amp</i> , <i>ERG2</i>	This work
pPERG2	recombined plasmid , <i>URA3</i> , <i>amp</i> , <i>PGK1p-ERG2</i>	This work
pMPERG2	recombined plasmid , <i>URA3</i> , <i>amp</i> , <i>PGK1p-ERG2</i>	This work
pPERG6	recombined plasmid , <i>URA3</i> , <i>amp</i> , <i>PGK1p-ERG6</i>	[ 8 ]
pPERG6-2	recombined plasmid , <i>URA3</i> , <i>amp</i> , <i>PGK1p-ERG2</i> , <i>PGK1p-ERG6</i>	This work
pVC727-6	recombined vector , <i>amp</i> , <i>PGK1p</i>	[ 10 ]
YEp352	cloning vector , <i>URA3</i> , <i>amp</i> 2 $\mu$ replication origin	[ 11 ]
pBluescript M13	cloning vector , <i>amp</i> , <i>LacZ</i>	[ 12 ]

## 1.2 DNA 操作

大肠杆菌感受态的制备、转化和质粒的提取参照文献 [13] 进行。酵母菌染色体 DNA 的制备及酵母菌的转化参照文献 [14] 进行。

## 1.3 引物设计与 PCR 扩增

根据 GenBank 中酿酒酵母 *ERG2* 基因的核苷酸序列设计引物 P2-L 5'-ACGGAATTCTGCTATCGTTC-TCGTTTGG-3' 和 P2-R 5'-ACTGGTACCTGAAGATTG-AGTTCATATC-3' , 分别引入 *EcoR* I 和 *Kpn* I 的酶切位点(用下划线标出)。以酿酒酵母 YE39 的总 DNA 为模板, 进行高保真的 PCR 扩增。

## 1.4 重组质粒的构建

*EcoR* I 和 *Kpn* I 酶切 PCR 产物, 并与相同酶切

的 pBluescript M13 连接, 构建克隆质粒 pERG2。用 *Bam*H I 和 *EcoR* I 酶切质粒 pVC727-6, 获得 1.9 kb 含 *PGK1p* 的 DNA 片段; 用 *EcoR* I 和 *Kpn* I 酶切质粒 pERG2, 获得 1.1 kb 的 *ERG2*。 *PGK1p* 和 *ERG2* 与经 *Bam*H I 和 *Kpn* I 酶切的 YEp352 进行连接, 构建重组质粒 pPERG2(图 2-A)。

用 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切质粒 pPERG2, 获得 *PGK1p-ERG2* 基因表达盒, 插入用同样酶切的 pBluescript M13, 构建重组质粒 pMPERG2。用 *Sma* I 和 *Sac* I 酶切 pMPERG2, 获得 *PGK1p-ERG2* 表达盒, 插入用同样酶切的 pPERG6(图 2-B), 构建 *ERG6* 和 *ERG2* 共表达的重组质粒 pPERG6-2(图 2-C)。

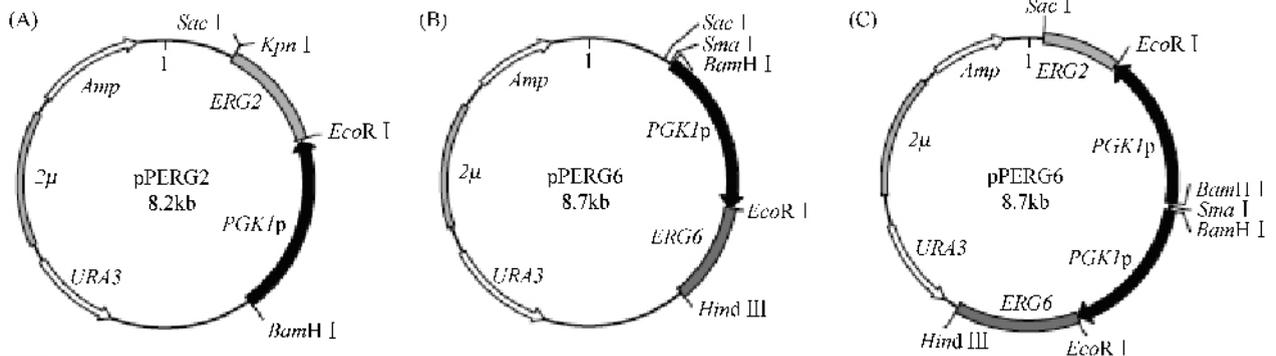


图 2 重组表达质粒 pPERG2、pPERG6、pPERG6-2 的物理图谱

Fig.2 Schematic diagram of recombinant plasmids pPERG2, pPERG6 and pPERG6-2. Restriction enzyme sites used in plasmid construction are shown.

## 1.5 RNA 的提取及 Northern 杂交

酵母菌总 RNA 的制备参照文献 [14] 进行。RNA 样品的纯度和浓度采用紫外分光光度法测定。*ERG6* 和 *ERG2* 特异性探针依照 Roche (Germany) 试剂盒说明用地高辛标记。等量的总 RNA 样品 (10  $\mu$ g) 经过甲醛变性凝胶电泳分离, 转移到尼龙膜上。转移及杂交过程参照文献 [13] 进行, 显色过程按照试剂盒说明进行。

## 1.6 甾醇的提取及甾醇组分的测定

甾醇的提取和测定参见文献 [15], 部分有所改动。取 0.5 g 湿菌体加入 10 mL 皂化液 (50% KOH

溶液: 无水乙醇 = 2:3), 88  $^{\circ}$ C 水浴 3 h, 取出冷却到室温, 加入石油醚萃取。取上层萃取液稀释 10 倍, 利用紫外分光光度法测定麦角甾醇的含量。

取上层萃取液挥发干燥, 加入氯仿溶解, 制成待测样品。以麦角甾醇作为外标, 气相色谱法 (GC) 测定样品中的甾醇组分和含量 (mg/g)。气相色谱法测定条件: 岛津 2010 气相色谱仪; 毛细管色谱柱 DB-5 (25.0 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m); 升温程序参照文献 [16]: 195  $^{\circ}$ C 3 min; 以 5.5  $^{\circ}$ C/min 升温至 300  $^{\circ}$ C, 持续 10 min; 进样口温度 280  $^{\circ}$ C; 进样体积: 1  $\mu$ L。每组实验重复 3 次, 每个样品进样 2 次。

## 2 结果

### 2.1 高表达 *ERG6* 对酿酒酵母甾醇组分和含量的影响

用表达质粒 pPERG6 转化酿酒酵母单倍体菌株 YS58, 通过营养缺陷互补, 在含有亮氨酸、组氨酸和色氨酸的 SC 培养基上筛选到转化子 YS58 (pPERG6); 同时转化空载体 YEp352 获得对照菌株 YS58 (YEp352)。Northern 杂交结果表明 *ERG6* 基因在重组菌株 YS58 (pPERG6) 中的表达量明显高于对照菌株 YS58 (YEp352) (图 3-A)。测定不同培养时间酵母细胞的麦角甾醇含量, 发现重组菌株 YS58

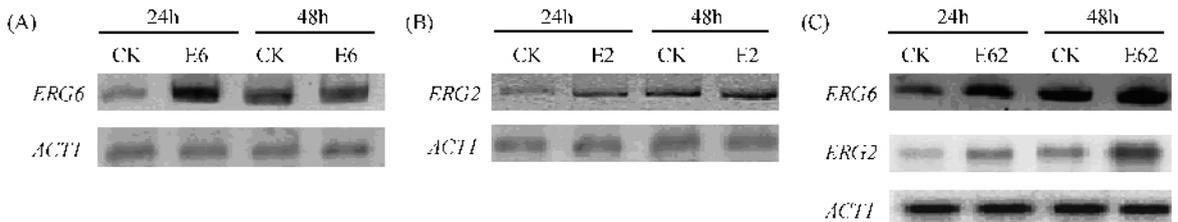


图 3 不同酵母菌株中 *ERG6* 和 *ERG2* 基因表达水平的 Northern 分析

Fig.3 Northern blot analysis of *ERG6* and *ERG2* expression in different recombinant strains. CK :YS58 (YEp352); E6 :YS58 (pPERG6); E2 :YS58 (pPERG2); E62 :YS58 (pPERG6-2).

### 2.2 *ERG2* 高表达对酿酒酵母甾醇组分和含量的影响

将 *ERG2* 重组表达质粒 pPERG2 转化酿酒酵母单倍体菌株 YS58, 通过营养缺陷互补筛选, 获得重组菌株 YS58 (pPERG2)。Northern 杂交分析表明 *ERG2* 在 *PGK1* 启动子调控下得到了高效表达 (图 3-B)。培养不同时间后收集细胞, 紫外分光光度法测定细胞麦角甾醇含量, 结果发现在检测的时间范围内, 重组菌株 YS58 (pPERG2) 的麦角甾醇含量始终低于对照菌株 (图 4)。利用气相色谱法对培养 36 h 后细胞甾醇组分和含量进行分析, 从表 2 数据可以看出重组菌株 YS58 (pPERG2) 中从羊毛甾醇到麦角甾

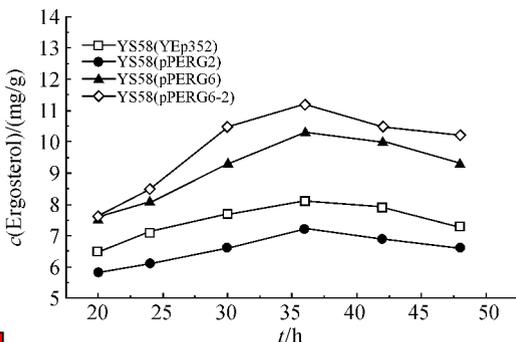


图 4 不同酵母菌株麦角甾醇含量随时间的变化曲线

Fig.4 Time course of ergosterol content in different recombinant strains.

(pPERG6) 的麦角甾醇含量始终高于对照菌株, 并且在 36 h 达到最高 (图 4)。使用气相色谱法对培养 36 h 酵母细胞的甾醇组分和含量进行测定和显著性分析, 结果发现: 与对照菌株 YS58 (YEp352) 相比, 重组菌株 YS58 (pPERG6) 的总甾醇和其它甾醇组分均有不同程度的提高。其中, 终产物麦角甾醇的含量是对照菌株的 1.27 倍, 最为明显的是中间体 4,4-二甲基酵母甾醇的含量是对照菌株的 3.41 倍 (表 2)。实验结果表明甾醇 C-24 甲基转移酶活性提高增强了酵母菌甾醇生物合成能力, 该酶催化反应可能是甾醇生物合成途径中的重要限速步骤。

醇的转化过程中的各甾醇中间体和终产物的含量均比对照菌株 YS58 (YEp352) 低, 总甾醇含量是对照菌株的 77% (表 2), 甾醇 C-8 异构酶活性提高对酵母菌甾醇合成产生了抑制作用。上述结果预示在甾醇 C-8 异构酶催化反应的上游存在着限速步骤。

### 2.3 *ERG6* 和 *ERG2* 在酿酒酵母中的共表达

*ERG6* 编码的甾醇 C-24 甲基转移酶与 *ERG2* 编码的甾醇 C-8 异构酶所催化的反应在麦角甾醇生物合成途径中是两个连续的步骤。为了验证甾醇 C-24 甲基转移酶催化的反应是否为甾醇 C-8 异构酶催化反应的直接上游限制因素, 将 *ERG6* 和 *ERG2* 的共表达质粒转化酵母菌 YS58, 获得重组菌株 YS58 (pPERG6-2)。Northern 分析证实 *ERG6* 和 *ERG2* 分别在 *PGK1* 强启动子的作用下实现了高效共表达 (图 3-C)。发酵实验结果显示重组菌株 YS58 (pPERG6-2) 的麦角甾醇含量比两个基因分别单独表达时的麦角甾醇含量均有提高 (图 4)。气相色谱分析表明 *ERG6* 和 *ERG2* 共表达重组菌株的麦角甾醇及甾醇中间体含量与对照菌株 YS58 (YEp352) 高表达 *ERG6* 的重组菌株 YS58 (pPERG6) 及高表达 *ERG2* 的重组菌株 YS58 (pPERG2) 相比均有不同程度的提高。*ERG6* 和 *ERG2* 共表达重组菌株的总甾醇含量是对照菌株的 1.54 倍, 其中麦角甾醇含量是对照菌的 1.41 倍。与单独表达 *ERG6* 的重组菌株相比, 共表达菌株中酵母

甾醇 ( Zymosterol ) 粪甾醇 ( Fecosterol ) 表甾醇 ( Episterol ) 等中间体和终产物麦角甾醇的含量均进一步提高。以上结果显示 *ERG6* 基因高表达对酵母菌甾醇生物合成代谢的增强效应不仅补偿了 *ERG2* 基

因高表达对甾醇合成产生的负效应,而且进一步增强了酵母菌麦角甾醇生物合成的能力。因此, *ERG6* 编码的甾醇 C-24 甲基转移酶催化的反应是酵母菌麦角甾醇生物合成途径中一个重要的限速步骤。

表 2 不同酵母菌株中甾醇组分和含量比较

Table 2 Sterol composition and content in different recombinant strains

Sterol composition	Recombinant strains			
	YS58( YEp352 )	YS58( pPERG2 )	YS58( pPERG6 )	YS58( pPERG6-2 )
Squalene	1.71 <b>1.00</b>	1.16 <b>0.68</b>	1.86 <b>1.06</b>	1.68 <b>0.98</b>
Lanosterol	1.07 <b>1.00</b>	0.86 <b>0.80</b>	1.80 <b>1.68</b>	1.78 <b>1.66</b>
4 <i>A</i> -dimethylzymosterol	0.39 <b>1.00</b>	0.33 <b>0.84</b>	1.33 <b>3.41</b>	1.21 <b>3.10</b>
Zymosterol	1.03 <b>1.00</b>	0.92 <b>0.89</b>	1.36 <b>1.32</b>	1.49 <b>1.45</b>
Fecosterol	1.08 <b>1.00</b>	0.86 <b>0.80</b>	1.33 <b>1.23</b>	1.54 <b>1.43</b>
Episterol	0.60 <b>1.00</b>	0.47 <b>0.78</b>	1.11 <b>1.85</b>	1.33 <b>2.22</b>
Ergosta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol	1.00 <b>1.00</b>	0.75 <b>0.75</b>	1.46 <b>1.46</b>	1.46 <b>1.46</b>
Ergosterol	6.37 <b>1.00</b>	4.68 <b>0.73</b>	8.08 <b>1.27</b>	9.01 <b>1.41</b>
Total sterols	11.54 <b>1.00</b>	8.87 <b>0.77</b>	16.47 <b>1.43</b>	17.82 <b>1.54</b>

Note :Data are given as milligram sterol per gram dry matter ( small letters ) and as the factor of change ( bold letters ) of individual sterol relative to the control strain YS58( YEp352 ) carrying the empty vector . Values represent the means of three independent experiments . The standard deviation for each sample was less than 5% .

### 3 讨论

麦角甾醇是酵母菌产生的具有重要经济价值的代谢产物,被广泛用作医药工业原料。酵母菌中麦角甾醇的生物合成是一个复杂的酶促反应过程,具有复杂的调控机制。尽管已有研究表明麦角甾醇生物合成的调控作用主要在基因的转录水平,通过基因工程技术解除转录水平的调控,使催化麦角甾醇生物合成的酶高效表达是改变细胞内甾醇生物合成的有效途径,但由于不同基因编码酶催化的反应在整个甾醇合成途径中的位置不同,因此不同酶活性提高对细胞甾醇合成能力的影响有明显的差异<sup>[3-8]</sup>。研究不同基因高效表达与细胞甾醇组分和含量变化之间的对应关系,不仅有利于深入了解甾醇合成代谢的调控机制,而且将为麦角甾醇生物合成的定向优化提供理论依据。

*ERG2* 基因编码的甾醇 C-8 异构酶催化粪甾醇的  $\Delta^8$  不饱和键异构化为  $\Delta^7$  不饱和键形成表甾醇,本研究发现该酶反应活性提高对酵母细胞甾醇合成产生了抑制作用,分析其原因,一方面在该反应上下游可能存在关键的限速步骤,另一方面甾醇 C-8 异构酶活性提高可能在细胞内产生了某种对甾醇合成具有抑制作用的中间代谢物。甾醇 C-8 异构酶催化

反应上游是 *ERG6* 基因编码的甾醇 C-24 甲基转移酶催化的反应,我们的前期研究发现 *ERG6* 高表达使细胞麦角甾醇含量提高<sup>[8]</sup>,本研究通过对 *ERG6* 高表达菌株中甾醇组分和含量的气相色谱分析,发现甾醇 C-24 甲基转移酶活性与酵母菌甾醇合成能力成正相关,它所催化的反应可能是甾醇合成代谢中的重要限速步骤。在酵母细胞中同时提高甾醇 C-24 甲基转移酶和甾醇 C-8 异构酶活性,不但解除了 *ERG2* 高表达对细胞甾醇合成的抑制作用,而且使甾醇 C-24 甲基转移酶对甾醇合成的激活效应进一步增强,说明 *ERG6* 编码的甾醇 C-24 甲基转移酶是酵母菌甾醇生物合成途径中重要的限速酶,在单独表达 *ERG2* 的酵母细胞中,甾醇 C-24 甲基转移酶反应产物粪甾醇的低水平是限制甾醇合成的一个重要因素。本研究在国内外首次发现甾醇 C-24 甲基转移酶是酵母甾醇生物合成途径中具有正向调控效应的限速酶,为通过基因工程技术优化工业酵母菌株麦角甾醇合成奠定了重要理论基础。

### 参考文献

- [ 1 ] Lees ND ,Bard M ,Kirsch DR . Biochemistry and molecular biology of sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* . *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* ,

- 1999, 34(1) 33–47.
- [ 2 ] Subbiah MT, Abplanalp W. Ergosterol (major sterol of baker's and brewer's yeast extracts) inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and the potential role of its oxidation products. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 2003 73(1) :19–23.
- [ 3 ] Polakowski T, Stahl U, Lang C. Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1998 49(1) 66–71.
- [ 4 ] Veen M, Stahl U, Lang C. Combined overexpression of genes of the ergosterol biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 2003 4(1) 87–95.
- [ 5 ] He XP, Zhang BR, Tan HR. Overexpression of a sterol C-24 (28) reductase increases ergosterol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* 2003 25(10) 773–778.
- [ 6 ] Polakowski T, Bastl R, Stahl U, et al. Enhanced sterol-acyl transferase activity promotes sterol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1999 53(1) 30–35.
- [ 7 ] 何秀萍, 郭雪娜, 张博润, 等. 甾醇酰基转移酶基因高表达对酵母菌麦角甾醇合成的影响. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* 2004 44(1) 67–71.
- [ 8 ] 孟云霞, 何秀萍, 刘楠, 等. 甾醇 C-24 甲基转移酶基因在酿酒酵母中的内源表达及工程菌麦角甾醇的合成. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)* 2008, 24(1) 40–45.
- [ 9 ] Teunissen AW, Van den Berg JA, Steensma HY. Physical localization of the flocculation gene *FLO1* on chromosome I of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1993, 9(1) :1–10.
- [ 10 ] 刘玉方, 朱邦民, 蔡金科. 酿酒酵母 3-磷酸甘油激酶基因(*PGK1*)启动子的亚克隆. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* 1995 35(1) 21–27.
- [ 11 ] Hill JE, Meyers AM, Koerner TJ, et al. Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* 1986 2(3) 163–167.
- [ 12 ] Altling-Mees MA, Short JM. pBluescript II :gene mapping vectors. *Nucleic Acids Research* 1989 17(22) 9494.
- [ 13 ] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning :a laboratory manual. 3<sup>rd</sup> ed. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.
- [ 14 ] Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA, et al. Methods in Yeast Genetics :a Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- [ 15 ] He X, Huai W, Tie C, et al. Breeding of high ergosterol-producing yeast strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2000 25(1) 39–44.
- [ 16 ] Bard M, Bruner DA, Pierson CA, et al. Cloning and characterization of *ERG25* the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding C-4 sterol methyl oxidase. *The Proceedings of the National Academy Sciences USA* 1996 93(1) :186–190.

## Regulation role of sterol C-24 methyltransferase and sterol C-8 isomerase in the ergosterol biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae*

Zhenying Zhang<sup>1,2</sup>, Xiuping He<sup>1\*</sup>, Weiwei Li<sup>1,2</sup>, Ying Lu<sup>1</sup>, Zhaoyue Wang<sup>1</sup>, Borun Zhang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Laboratory of Yeast Molecular Genetics and Breeding, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(<sup>2</sup> Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract [ Objective ]** Ergosterol is a fungal metabolite with economic importance. For ergosterol biosynthesis, to identify the bottleneck enzymes in the metabolic pathway is of crucial importance. [ **Methods** ] Sterol C-8 isomerase encoding gene *ERG2* was cloned from *Saccharomyces cerevisiae* by PCR. To evaluate the effect of *ERG2* overexpression on the sterol content in the yeast, the expression plasmid pPERG2 was constructed and transformed into *S. cerevisiae* strain YS58 to generate recombinant strain YS58(pPERG2). In addition, the regulation role of sterol C-24 methyltransferase, encoded by *ERG6*, in ergosterol biosynthesis was further verified by analysis of sterol components and levels in yeast strains overexpressing *ERG6*, *ERG2* respectively, or overexpressing *ERG6* and *ERG2* simultaneously. [ **Results** ] Ergosterol content and all sterol intermediates increased largely by overexpressing *ERG6* in *S. cerevisiae*. Although the overexpression of sterol C-8 isomerase encoded by *ERG2* alone had negative effect on ergosterol biosynthesis, overexpression of *ERG6* and *ERG2* simultaneously led to an increased ergosterol level, which was 1.41-fold of that in empty vector strain, 1.92-fold of that in *ERG2* only overexpressing strain and 1.12-fold of that in *ERG6* only overexpressing strain. [ **Conclusion** ] These results demonstrated that sterol C-24 methyltransferase is an important bottleneck enzyme for ergosterol biosynthesis in *S. cerevisiae*.

**Keywords :** sterol C-24 methyltransferase ; sterol C-8 isomerase ; overexpression ; ergosterol ; *Saccharomyces cerevisiae*

( 本文责编 张晓丽, 谷志静 )