

氧化胁迫对酿酒酵母 NAD(H)激酶突变体 呼吸链活性的影响

史锋¹ 孙明娣¹ 李志君¹ 李永富^{2*}

(1. 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 江苏 无锡 214122)

摘要: 【目的】了解酿酒酵母线粒体 NAD(H)激酶 Pos5p 对呼吸链活性的维持是否与其抗氧化功能有关。【方法】比较在不同类型的氧化胁迫试剂作用下, 野生菌 BY4742、POS5 基因缺失体 *pos5Δ* 及其回补体 *pos5Δ/POS5-YEp* 的呼吸链各个酶复合体的活性变化及胞内活性氧水平变化。【结果】在非胁迫条件下, *pos5Δ* 的各个复合体活性明显低于 BY4742, 而 *pos5Δ/POS5-YEp* 的活性有所恢复, 这与它们的胞内活性氧水平相一致。在甲萘醌胁迫下, BY4742 和 *pos5Δ* 的各个复合体活性都发生不同程度的下降, 但 *pos5Δ/POS5-YEp* 的活性都升高。在 H₂O₂、马来酸二乙酯胁迫下, 除个别复合体外, BY4742、*pos5Δ* 和 *pos5Δ/POS5-YEp* 的呼吸链复合体活性都降低, 尤以 *pos5Δ* 的活性降低最为严重, BY4742 的活性降低则较少, 而 *pos5Δ/POS5-YEp* 在 H₂O₂ 胁迫下的活性降低得到了缓解。说明甲萘醌、H₂O₂ 和马来酸二乙酯胁迫会造成酿酒酵母呼吸链各个复合体发生损伤, 而过表达 Pos5p 则有助于缓解甲萘醌和 H₂O₂ 引起的损伤。【结论】Pos5p 对呼吸链的作用与其抗氧化功能有相关性。

关键词: 酿酒酵母, 氧化胁迫, NAD(H)激酶, 呼吸链活性, 活性氧

The influence of oxidative stress on the respiratory chain activity of *Saccharomyces cerevisiae* NAD(H) kinase mutant

SHI Feng¹ SUN Ming-Di¹ LI Zhi-Jun¹ LI Yong-Fu^{2*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] To realize the relationship between respiratory maintenance and anti-oxidative function of Pos5p, the mitochondrial NAD(H) kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. [Methods] The respiratory chain activity and reactive oxygen species (ROS) level of wild-type BY4742, *POS5* gene deletion mutant *pos5Δ*, and *pos5Δ* containing *POS5*-YEplac195 plasmid (*pos5Δ/POS5*-YE) under exposure to different kinds of oxidative reagents were compared. [Results] At the normal growth condition, *pos5Δ* exhibited poorer respiratory chain activity than that of BY4742, while *pos5Δ/POS5*-YE gave the partial restored activity, consistent with the ROS level of these three strains. Under the oxidative stress of menadione, the respiratory chain activities of BY4742 and *pos5Δ* decreased, while that of *pos5Δ/POS5*-YE increased. Under the oxidative stress of H₂O₂ and diethyl maleate, nearly all of the activities of BY4742, *pos5Δ* and *pos5Δ/POS5*-YE reduced, with that of *pos5Δ* most seriously, and that of *pos5Δ/POS5*-YE under H₂O₂ lessened. Thus indicated that the oxidative stress would injury the respiratory chain complex of *S. cerevisiae* and over-expression of Pos5p could alleviate the injury from menadione and H₂O₂. [Conclusion] The protecting function of Pos5p on respiratory chain was correlated to its antioxidative defense function.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Oxidative stress, NAD(H) kinase, Respiratory chain activity, Reactive oxygen species

酿酒酵母既是发酵和焙烤食品中常用的工业应用微生物,也是一种典型的模式真核微生物。酿酒酵母的生长和代谢既可以在无氧条件下进行,也可以在有氧条件下进行。在有氧条件下,氧气一方面促进了细胞内生物氧化过程的进行和生物能量的产生,有助于细胞的生长;另一方面又促使细胞不断产生活性氧(Reactive oxygen species, ROS),可能引发蛋白质、DNA、脂类等发生损伤^[1]。为了清除多余的 ROS,酿酒酵母细胞内建立了一套完善的抗氧化防御体系^[2]。

在 ROS 产生的主要场所线粒体内,除了以谷胱甘肽(GSH)为代表的还原剂之外,还有许多酶参与 ROS 的解毒反应,包括清除超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)的超氧化物歧化酶,清除过氧化物的谷胱甘肽过氧化物酶或硫氧还蛋白过氧化物酶等,以及维持这些过氧化物酶活性的谷胱甘肽还原酶或硫氧还蛋白还原酶等。后两者在彻底清除过氧化物的过程中,最终需要线粒体 NADPH 作为还原剂^[1]。线粒体 NADPH 主要由线粒体 NAD(H) 激酶(Pos5p)和多种 NADP⁺依赖性脱氢酶提供。其

中 Pos5p 是线粒体 NADP⁺ 和 NADPH 从头合成的关键酶, 而其他 NADP⁺ 依赖性脱氢酶则首先需要 Pos5p 合成的 NADP⁺, 才能产生 NADPH, 因此 Pos5p 是线粒体 NADPH 的主要来源, 这已得到实验证明^[3]。

对野生型和突变型酿酒酵母的氧化胁迫生长表型研究证实, 酿酒酵母细胞在面临不同类型的氧化胁迫时, 包括超氧阴离子生成试剂(如甲萘醌 VK₃)、过氧化氢 H₂O₂、GSH 消耗试剂(如马来酸二乙酯 DEM), *pos5Δ* 都表现出明显的生长缺陷, 其缺陷通常强于各种抗氧化基因单缺失体^[4]。因此 Pos5p 对细胞抗氧化系统具有重要的作用。*pos5Δ* 除了表现出抗氧化功能障碍以外, 对非发酵性碳源如甘油、乙酸的利用能力也大幅降低, 说明 *pos5Δ* 存在呼吸缺陷, 而对 *pos5Δ* 线粒体呼吸链酶复合体活性的测定结果也显示, 复合体 II+III、III、IV 的活性发生不同程度的降低^[5]。为了了解 *pos5Δ* 的呼吸缺陷是否与细胞所面临的氧化胁迫有关, 于是分析了不同氧化胁迫试剂作用下, 酿酒酵母野生菌和 *pos5Δ* 及回补体的呼吸链各个酶复合体的活性变化, 以揭示 Pos5p 对呼吸系统和抗氧化系统的功能维持之间是否存在相关性。

1 材料与方 法

1.1 菌株和培养基

本研究中所用的酿酒酵母野生菌株(BY4742)和线粒体 NAD(H) 激酶基因缺失体(*pos5Δ*)购自 EUROSCARF, *POS5* 基因回补体(*pos5Δ/POS5-YEp*)为前期研究构建^[6]。

酿酒酵母的培养采用 SD 培养基: 0.67% 无氮氨基酸酵母氮基础(YNB), 2% 葡萄糖, 加入相应的氨基酸和碱基, pH 5.0。固体培养基加入 2% 琼脂。

1.2 酿酒酵母线粒体的制备

酿酒酵母线粒体的提取采用差示离心法^[5,7-8]。

细胞在 SD 培养基中培养至对数期, 测试氧化胁迫影响时继续加入氧化胁迫试剂(1 mmol/L VK₃ 或 2 mmol/L H₂O₂ 或 2 mmol/L DEM)作用 2 h 收集细胞, 清洗后重悬并制备原生质体, 随后再生原生质球, 经高压匀浆破碎后通过差示离心法获得线粒体沉淀。最后将线粒体沉淀重悬于 4 °C、pH 7.5 的 PBS 缓冲液中至蛋白质的终浓度为 1–5 g/L。蛋白质的浓度采用 Bradford 法测定, 以牛血清白蛋白(BSA)作为标样。

1.3 酿酒酵母线粒体呼吸链酶复合体活性的测定

线粒体呼吸链酶复合体 II、复合体 III、复合体 IV 和复合体 II+III 的活性采用分光光度法测定^[5,8-9]。测试时 1 mL 反应体系的成分如表 1 所示, 反应缓冲液在 30 °C 平衡 5 min 后, 加入 20 μL 线粒体溶液开始反应, 利用 Cary 50 紫外/可见分光光度计监测 30 °C 反应时光吸收的变化, 通过光吸收的变化率计算酶活, 对对照不加线粒体。酶活以每分钟每毫克酶蛋白还原或氧化底物的微摩尔数表示。酶复合体 II 的活性根据 2,6-二氯酚(DCPIP)被癸基泛醌(DBH₂)、FADH₂、琥珀酸还原后的 OD₆₀₀ 下降率计算, 酶复合体 III 的活性根据氧化态细胞色素 c 被 DBH₂ 还原后的 OD₅₅₀ 升高率计算, 酶复合体 II+III 的活性根据氧化态细胞色素 c 被琥珀酸还原后的 OD₅₅₀ 升高率计算, 酶复合体 IV 的活性根据还原态细胞色素 c 被 O₂ 氧化后的 OD₅₅₀ 下降率计算。

1.4 细胞内 ROS 水平的测定

酿酒酵母细胞分别在 SD 培养基中培养至对数期, 测试氧化胁迫影响时继续加入氧化胁迫试剂(1 mmol/L VK₃ 或 2 mmol/L H₂O₂ 或 2 mmol/L DEM)作用 1 h 收集细胞, 用无菌水清洗细胞后, 用 pH 7.5 的 PBS 溶液将各样品稀释至 OD₆₀₀=1.0 的细胞悬液, 吸取 1 mL, 加入 5 μL 20 mmol/L 2',7'-二氢二氯荧光黄双乙酸钠(DCFH-DA)溶液,

表 1 呼吸链酶复合体活性测定时反应体系的组成
Table 1 Composition of solutions for detection of enzyme activities in the respiratory chain complex

Composition	Enzyme complex (μL)			
	II	III	IV	II+III
250 mmol/L PBS, 50 mmol/L MgCl_2 , pH 7.2	100	100	–	100
200 mmol/L PBS, pH 7.0	–	–	100	–
25 g/L BSA	40	40	40	–
50 mmol/L n-dodecylmaltoside	–	20	9	–
1 mol/L KCN	2	2	–	2
1 mol/L Succinic acid	20	–	–	20
50 mmol/L Decylubiquinone (DB)	1	–	–	–
5 mmol/L 2,6-Dichlorophenolindophenol (DCPIP)	10	–	–	–
50 mmol/L Decylubiquinol (DBH_2)	–	2	–	–
2.5 mmol/L Oxidized cytochrome c	–	6	–	15
1 mmol/L Reduced cytochrome c	–	–	15	–
H_2O	807	810	816	843
1 g/L Mitochondria solution	20	20	20	20

37 °C 避光温育 30 min, 然后用 PBS 溶液洗涤细胞, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。细胞用 PBS 溶液重悬后, 用日立 650-60 荧光分光光度计测定细胞的荧光强度, 激发波长为 498 nm, 发射波长为 522 nm, 以荧光强度表示 ROS 的相对量^[10], 即细胞内的 ROS 水平。

2 结果与讨论

2.1 非胁迫条件下酿酒酵母的呼吸链活性

在不含氧化胁迫试剂的 SD 培养基中生长时, *pos5 Δ* 的线粒体呼吸链酶复合体 II、II+III、III 和 IV 的活性相对于野生菌 BY4742 都发生不同程度的降低, 而回补体 *pos5 Δ /POS5-YEp* 的各个酶复合体活性相对于 *pos5 Δ* 则略有上升, 但都没有恢复到 BY4742 的水平(图 1A–1C, 黑柱), 说明 Pos5p 和线粒体 NADPH 的有效供应对维持呼吸链各个酶复合体的活性非常重要。3 种细胞复合体活性的变化与它们细胞内的 ROS 水平相一致

(图 1D, 黑柱)。ROS 是导致线粒体 DNA (mtDNA) 不稳定性的重要因素^[11]。在构成复合体 IV 的 12 种亚基中, 3 种最大和疏水性最强的亚基由 mtDNA 编码; 在构成复合体 III 的 10 种亚基中, 1 种由 mtDNA 编码。

最近的研究还表明^[12], *pos5 Δ* 的线粒体不能有效合成铁-硫聚簇, 包括 Fe-S、2Fe-2S 和 4Fe-4S 聚簇, 而在野生细胞内过量表达 Pos5p 时, 铁-硫聚簇的合成显著增强, 说明在铁-硫聚簇的合成中有一步甚至多步反应需要线粒体 NADPH。复合体 II 中含有多种铁-硫聚簇, 包括 Fe-S、2Fe-2S、4Fe-4S 聚簇, 复合体 III 中也含有 2Fe-2S 聚簇, 铁-硫聚簇的合成受阻也会导致 *pos5 Δ* 和回补体的复合体活性下降。

2.2 甲萘醌对酿酒酵母呼吸链活性的影响

在 1 mmol/L VK_3 胁迫下, BY4742 的复合体 II、II+III、III 和 IV 的活性都降低, 降低幅度从 23% 至 43% 不等, 平均降低了 31% (图 1A); *pos5 Δ*

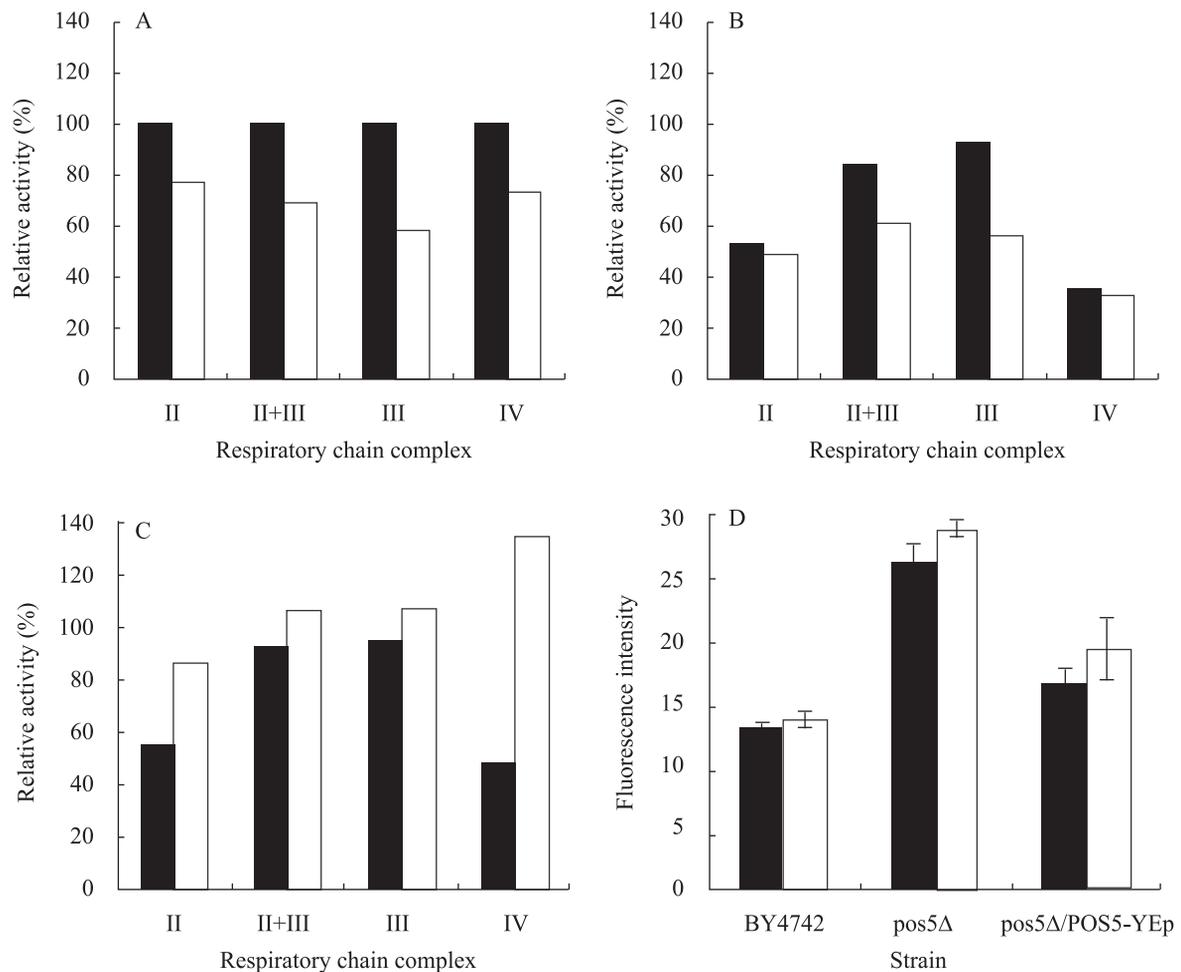


图 1 甲萘醌胁迫下呼吸链酶复合体活性变化和 ROS 水平变化

Fig. 1 The relative activities of respiratory chain complexes and ROS level under menadione (VK₃)

注: A: BY4742 的活性; B: *pos5Δ* 的活性; C: *pos5Δ/POS5-YEp* 的活性; D: ROS 水平。黑框: 无 VK₃ 胁迫; 白框: 1 mmol/L VK₃ 胁迫。

Note: A: Activities of BY4742; B: Activities of *pos5Δ*; C: Activities of *pos5Δ/POS5-YEp*; D: ROS level. Black bar: Without VK₃; White bar: With 1 mmol/L VK₃.

的复合体 II、II+III、III 和 IV 的活性也都在原先的基础上进一步降低(图 1B), 说明 VK₃ 胁迫使它们的呼吸链发生了损伤, 这与 VK₃ 胁迫下细胞内 ROS 水平增高(图 1D)相一致。但有趣的是, 在 1 mmol/L VK₃ 的作用下, 回补体 *pos5Δ/POS5-YEp* 的复合体 II、II+III、III 和 IV 活性都有所升高, 增高幅度从 14% 到 67% 不等(图 1C), 虽然其细胞内的 ROS 水平也提高。这与回补体在 1 mmol/L VK₃ 中基本恢复正常的生长表型^[4]相一致。

2.3 过氧化氢对酿酒酵母呼吸链活性的影响

相对于·O₂⁻和羟自由基(·OH)而言, 过氧化氢是一种最容易扩散的 ROS 成分, 它极易渗透到细胞内的各组份中与一些活性分子发生反应, 使它们发生过氧化。它对细胞的损伤虽然不如·OH 那么严重, 但若得不到及时清除, 它可以与 Fe²⁺/Cu⁺通过 Fenton 反应生成·OH。

BY4742 在 2 mmol/L H₂O₂ 胁迫下, 除复合体 III 之外, 复合体 II、II+III 和 IV 的活性降低, 但

降低幅度不高, 平均降低 23% (图 2A), 说明此胁迫对 BY4742 的呼吸链活性所造成的损害不如 VK₃ 胁迫严重。这与 2 mmol/L H₂O₂ 作用 1 h 后 ROS 水平没有增高相一致 (图 2D), 即渗入 BY4742 细胞内的 H₂O₂ 在 1 h 之内即被清除。*pos5Δ* 的复合体 II+III、III 和 IV 的活性在原先的基础上进一步降低, 尤其以复合体 III 活性的降低最为严重 (图 2B), 说明呼吸链的损伤加剧, 尽管 *pos5Δ* 细胞在 1 h 之内也能清除渗入的 H₂O₂ (图 2D), 但 H₂O₂ 的高扩散性使得线粒体 DNA 和蛋

白质极易发生氧化损伤。回补体 *pos5Δ/POS5-YEp* 的复合体 II+III、III 和 IV 的活性虽然也在原先的基础上有所下降, 但幅度较小, 而复合体 II 的活性反而有所提高 (图 2C), 说明 *POS5* 基因的表达有助于细胞抵抗 2 mmol/L H₂O₂ 对呼吸链的损伤, 图 2D 也显示回补体中 ROS 水平确实下降。需要说明的是, 与 VK₃ 作用后不同的是, 野生菌、突变体和回补体在 2 mmol/L H₂O₂ 作用 1 h 后 ROS 水平都下降, 这印证了 H₂O₂ 会诱导细胞内的抗氧化适应机制发挥作用^[13]。

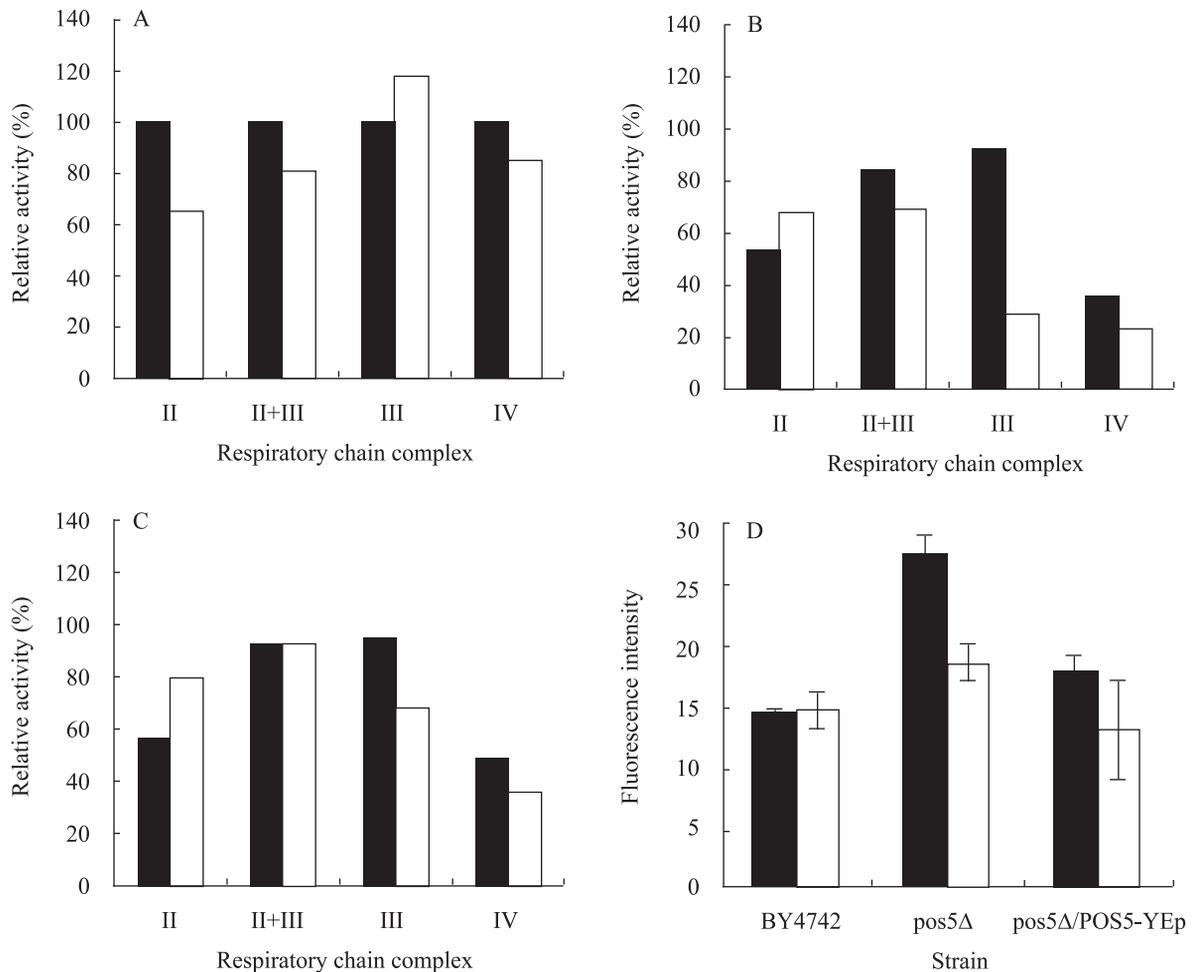


图 2 过氧化氢胁迫下呼吸链酶复合体活性变化和 ROS 水平变化

Fig. 2 The relative activities of respiratory chain complexes and ROS level under hydrogen peroxide (H₂O₂)

注: A: BY4742 的活性; B: *pos5Δ* 的活性; C: *pos5Δ/POS5-YEp* 的活性; D: ROS 水平。黑框: 无 H₂O₂ 胁迫; 白框: 2 mmol/L H₂O₂ 胁迫。
Note: A: Activities of BY4742; B: Activities of *pos5Δ*; C: Activities of *pos5Δ/POS5-YEp*; D: ROS level. Black bar: Without H₂O₂; White bar: With 2 mmol/L H₂O₂.

2.4 马来酸二乙酯对酿酒酵母呼吸链活性的影响

马来酸二乙酯(DEM)是一种 GSH 消耗试剂,它并不会产生任何形式的 ROS,但是它通过与 GSH 结合并使其浓度降低,削弱 GSH 的抗氧化功能而引起氧化胁迫^[14]。

BY4742 经 2 mmol/L DEM 胁迫后,除复合体 II 之外,复合体 II+III、III 和 IV 的活性都降低,尤以复合体 IV 的活性降低最严重(图 3A); *pos5Δ* 的复合体 II、II+III、III 和 IV 的活性也都在原先的

基础上进一步大幅降低(图 3B),表明 DEM 胁迫对 *pos5Δ* 的呼吸链损伤非常严重,程度超过 VK₃ 和 H₂O₂ 胁迫,这也说明 GSH 在维持呼吸链活性中起到非常重要的作用,这与 GSH 在抗氧化系统中的核心地位有关。而回补体中复合体 II、II+III、III 和 IV 的活性降低并没有得到任何缓解(图 3C),说明即便回补 *POS5* 基因也无法减缓 DEM 对呼吸链的损伤,再次表明 DEM 胁迫会对细胞造成非常严重的损害。尽管 DEM 胁迫并不会增高这 3 种细胞内的 ROS 水平(图 3D)。

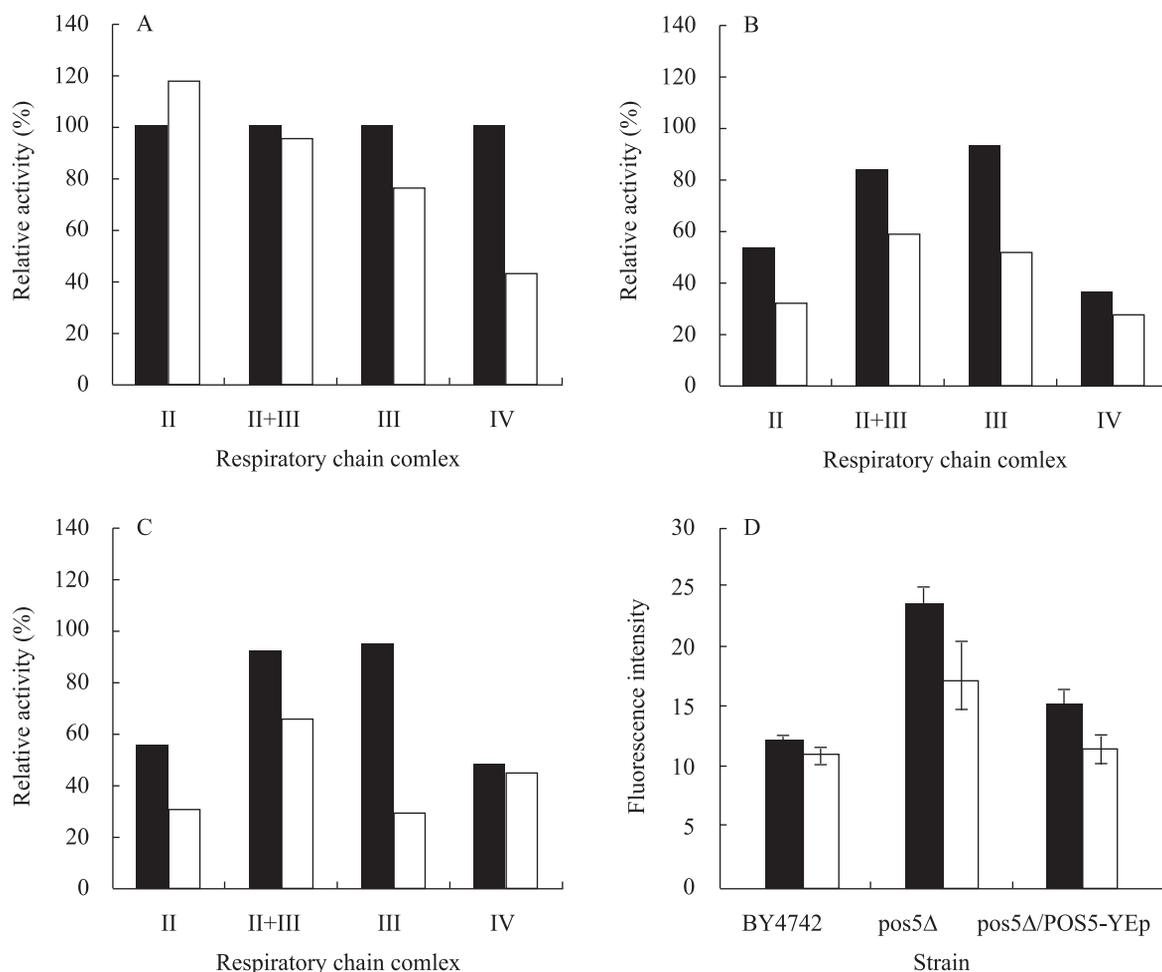


图 3 马来酸二乙酯胁迫下呼吸链酶复合体活性变化和 ROS 水平变化

Fig. 3 The relative activities of respiratory chain complexes and ROS level under diethyl maleate (DEM)

注: A: BY4742 的活性; B: *pos5Δ* 的活性; C: *pos5Δ/POS5-YEp* 的活性; D: ROS 水平. 黑框: 无 DEM 胁迫; 白框: 2 mmol/L DEM 胁迫.
Note: A: Activities of BY4742; B: Activities of *pos5Δ*; C: Activities of *pos5Δ/POS5-YEp*; D: ROS level. Black bar: Without DEM; White bar: With 2 mmol/L DEM.

3 结论

酿酒酵母是一种重要的真核微生物,它在生长过程中会面临各种各样的胁迫,氧化胁迫是最主要的胁迫之一。本文通过研究酿酒酵母野生菌和突变体在应对氧化胁迫时呼吸链各个酶复合体的活性变化,证明酿酒酵母 *POS5* 基因的缺失会导致细胞内 ROS 水平的升高和呼吸链各个酶复合体活性的降低。在超氧生成试剂 VK_3 、过氧化氢和 GSH 消耗试剂 DEM 胁迫下,野生菌的呼吸链各个酶复合体活性几乎都会降低, *pos5Δ* 的活性也在以前的基础上进一步大幅降低,回补体 *pos5Δ/POS5-YEp* 的活性在 VK_3 胁迫下升高,在 H_2O_2 胁迫下小幅降低,在 DEM 胁迫下则大幅降低,说明氧化胁迫会导致酿酒酵母的呼吸链发生损伤,尤其是 *pos5Δ*,而回补 *POS5* 基因虽能减缓 H_2O_2 所造成的损伤,但不能减缓 DEM 所造成的损伤。这些研究结果也表明 *pos5Δ* 的呼吸缺陷与它的抗氧化功能缺陷之间存在相关性,即 *pos5Δ* 胞内的高活性氧水平和所面临的氧化胁迫是导致其呼吸链发生损伤和活性降低的原因之一。这些研究不仅有助于揭示酿酒酵母的氧化胁迫适应机制,为工业发酵过程中提高酿酒酵母的逆境适应能力和发酵性能提供理论依据,还可以为人体细胞抗氧化功能的研究提供理论支持和借鉴。

参考文献

- [1] Hohmann S, Mager WH. Yeast stress responses[M]. Springer: Verlag Berlin Heidelberg, 2003: 241–303.
- [2] Jamieson DJ. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Yeast, 1998, 14(16): 1511–1527.
- [3] Miyagi H, Kawai S, Murata K. Two sources of mitochondrial NADPH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(12): 7553–7560.
- [4] 孙明娣, 史锋, 王小元. 酿酒酵母 NAD(H)激酶 Pos5p 在细胞抵抗氧化胁迫中的作用[J]. 微生物学通报, 2010, 37(12): 1740–1746.
- [5] Shi F, Li Z, Sun M, et al. The role of mitochondrial NADH kinase and NADPH supply in the respiratory chain activity of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2011, 43(12): 989–995.
- [6] Shi F, Kawai S, Mori S, et al. Identification of ATP-NADH kinase isozymes and their contribution to supply of NADP(H) in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEBS Journal, 2005, 272(13): 3337–3349.
- [7] Boldogh IR, Pon LA. Purification and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Methods Cell Biology, 2007, 80: 45–64.
- [8] Lemaire C, Dujardin G. Preparation of respiratory chain complexes from *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and mutant mitochondria: activity measurement and subunit composition analysis[J]. Methods Mol Biology, 2008, 432(1): 65–81.
- [9] Kirby DM, Thorburn DR, Turnbull DM, et al. Biochemical assays of respiratory chain complex activity[J]. Methods Cell Biology, 2007, 80: 93–119.
- [10] Armstrong JS, Whiteman M. Measurement of reactive oxygen species in cells and mitochondria[J]. Methods Cell Biology, 2007, 80: 355–377.
- [11] Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(3): 361–370.
- [12] Pain J, Balamurali MM, Dancis A, et al. Mitochondrial NADH kinase, Pos5p, is required for efficient iron-sulfur cluster biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(50): 39409–39424.
- [13] Boissard S, Lagniel G, Garmendia-Torres C, et al. H_2O_2 activates the nuclear localization of Msn2 and Maf1 through thioredoxins in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Eukaryotic Cell, 2009, 8(9): 1429–1438.
- [14] Nguyễn-nhu NT, Knoops B. Alkyl hydroperoxide reductase 1 protects *Saccharomyces cerevisiae* against metal ion toxicity and glutathione depletion[J]. Toxicology Letters, 2002, 135(3): 219–228.