中国科学（C 辑）
第 27 卷 第 1 期 SCIENCE IN CHINA (Series C) 1997 年 2 月

酵母 Pho80 对 Pho85 蛋白激酶活性的调节*

杨志勇 赵友阳 王 勤 敖世洲
（中国科学院上海生物化学研究所分子生物学国家重点实验室，上海 200031）

摘要 酵母 *pho*80 和 *pho*85 基因编码的蛋白质是阻遏型酸性磷酸酯酶基因表达调控系统中的 2 种负调控因子．其中 *pho*85 基因编码产物已被证明是 1 种类似于 $p34^{cdc2/CDC28}$ 的蛋白激酶，磷酸化该调控系统中的正调控因子 Pho4，并使之失活．用抗 *pho*85 抗体从啤酒酵母 YPH499 及其衍生菌株的细胞抽提液中得到 Pho85 免疫复合物，对大肠杆菌表达的 Pho4 蛋白进行了体外磷酸化分析，证实酵母 Pho80 是 Pho85 蛋白激酶活力所必需，*pho*80 基因的表达水平直接影响 Pho85 免疫复合物对 Pho4 蛋白的磷酸化程度．根据基因序列推导的 Pho80 蛋白氨基酸序列中，含有一段与几种 cyclin 同源的区域，通过寡核苷酸的插入或小片段缺失而对该区域及邻近部位在基因水平进行的微小改变均可导致 Pho80 丧失阻遏酸性磷酸酯酶基因表达的能力．

关键词 酵母 *pho*80 基因 cyclin 酵母 Pho85 蛋白激酶

酵母 *pho*5 基因编码一种分泌型的酸性磷酸酯酶，其表达在高磷培养条件下受到阻遏，低磷条件下则去阻遏．在转录水平上．*pho*5 受到 2 个正调控因子：Pho2 和 Pho4；2 个负调控因子：Pho80 和 Pho85 以及 1 个中介因子 Pho81 的调节[1]．同源性分析的结果显示 Pho85 与依赖 cyclin 激活的蛋白激酶 $p34^{cdc2/CDC28}$ 的同源性高达 50% 以上[2]．近来 Pho85 已被证明是一种蛋白激酶，通过磷酸化 Pho4 并使之失活而阻遏 *pho*5 基因的表达[3]．另一种负调控因子 Pho80 则与一些 cyclin(HCS26, OrdF) 有一定的同源性，很可能与 Pho85 蛋白激酶结合并调节其激酶活力[3]，正如 CLN1, CLN2, CLN3, CLB1, CLB2, CLB3 等 cyclins 结合 $p34^{cdc2/CDC28}$ 进而调节该激酶的活力[4]．阐明 Pho80 和 Pho85 的关系及它们相互作用的方式对于揭示酸性磷酸酯酶基因转录调控的机制有重要意义．

本文通过比较在不同的 *pho*80 表达水平下，Pho85 蛋白激酶体外磷酸化 Pho4 蛋白的能力，证实用较强启动子表达 *pho*80 时，Pho85 蛋白激酶对 Pho4 蛋白的磷酸化活性显著增加．用寡聚核苷酸的插入或基因片段的缺失，在保持原阅读框架的前提下，在基因水平对 Pho80 中部与 cyclin 同源的区域及邻近区域进行了改造，观察到该部分结构为 Pho80 发挥负调控功能所必需．

1995-07-11 收稿，1995-10-24 收修改稿
* 文内 *pho*80, *pho*85, *pho*84 示基因；Pho80, Pho85, Php4 示蛋白

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和培养基 大肠杆菌(*E. coli*)JM83:ara rpsL Δ (lac-proAB)Φ80 d lacZ Δ M15; BL21(DE3)lysS:hsdS gal(λ lts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 基因 1)(含有能小量表达 T7 溶菌酶的质粒 pLysS). 酵母菌(*S. cerevisiae*)YPH499: a ura3 lys2 ade2 trp1 his3 leu2 cir$^+$; *pho*80 缺失株 YPH499 *pho*80∶∶LEU2; *pho*85 缺失株 YPH499 *pho*85∶∶URA3.

YPD 培养基:2% 蛋白胨(Bacto-peptone), 1% 酵母抽提物(Bacto-yeast extract), 2% 葡萄糖;Burkholder's 高低磷培养基:按 Toh-e 等的配方[5]配制,针对不同菌株的营养缺陷补加氨基酸.

1.1.2 酶、限制性内切酶的接头、试剂盒及化学试剂 限制性内切酶、T4DNA 连接酶、Klenow 酶购自 Gibco BRL 公司;限制性内切酶的接头购自 Biolabs 公司;Western blotting 试剂盒(ProtoBlot II AP system with stabilized substrate, rabbit)购自 Promega 公司;苯甲基磺酰氟(PMSF)、胃蛋白酶抑制剂(pepstatin)、抑蛋白酶肽(aprotinin)、苯甲脒(benzamidine)等蛋白酶抑制剂均为 Sigma 公司产品;对硝基苯磷酸酯(pNpp)购自 Sigma 公司;葡萄球菌蛋白 A 交联的琼脂糖(4%)珠亦为 Sigma 公司产品;γ-^{32}P ATP 购自 Amersham 公司.

1.2 方法

1.2.1 方法 按照"分子克隆"所介绍的方法进行重组 DNA 操作.

1.2.2 Pho4 蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化 P_L 启动子控制下 *pho*4 基因在大肠杆菌 RR1 中的表达:*pho*4 表达菌 RR1(pBL*pho*4)的培养及诱导表达按先前的报道进行[6]. 50 mL 培养物 42℃ 热诱导后离心,菌体用 0.6 mL 裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 1 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA), 100 mmol/L 氯化钠)悬浮,加入 8 μL PMSF(10 mmol/L)和 16 μL 溶菌酶(10 mg/mL)破壁,再加入 4 μL 去氧胆酸溶液(0.2 g/mL)并搅拌至溶液呈粘稠状,用 DNase I 降解其中的 DNA, 15 000 r/min 离心 5 min 后保留上清液,加入饱和 $(NH_4)_2SO_4$-PBS 至表达上清液中 $(NH_4)_2SO_4$ 的浓度达到 40%, 10 000 r/min 离心 15 min,沉淀溶于适量磷酸缓冲液,再经凝胶过滤(Sephdex G-75)进行纯化.

*pho*4 基因与谷胱甘肽转移酶(Glutathione S-Transferase, GST)融合表达:先前构建的 pUC*pho*4P 质粒[6]用 BamH Ⅰ/Hind Ⅲ双酶切并补平,将回收到的 1.0 kb *pho*4 基因编码区连接到 EcoR I 酶切并补平的 pGEX-3X 质粒以保持阅读框架,构建成能表达 GST-Pho4 融合蛋白的表达质粒. 融合蛋白的诱导表达及纯化参照文献[7]方法进行.

1.2.3 Pho85 包涵体抗血清的制备 先前以包涵体形式表达并被纯化的 Pho85 蛋白[8] 1 mL(含 1 mg 蛋白)与同体积福氏佐剂混匀后分多点注射家兔后脚趾间皮下,2 周后左右后腿淋巴结内注射抗原,再过 1 周后经耳沿静脉加强,3 d 后同法再次加强. 3 d 后用 ELISA 的方法试血,抗血清效价为 10^5. 血清中的免疫球蛋白用常规硫酸铵沉淀的方法初步纯化后,用 PBS(pH7.4)稀释成 1 mg/mL.

1.2.4 Western blotting 用玻璃珠振荡破壁的方法制备酵母总蛋白抽提物. 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离蛋白,每孔上样量为 100 μg 酵母总蛋白. 半干法将蛋白转移至硝酸纤维膜上,按试剂盒推荐的方法进行免疫反应和染色.

1.2.5　用抗 Pho85 抗体从酵母总抽提物中制备免疫复合物　酵母单菌落接种于 YPD，于 30℃摇床生长至 OD_{660nm}为 1.0 左右，无菌水洗后按 OD_{660nm}为 0.05 的浓度转接至 Burkholder's 高磷培养基中，30℃摇 20 h. 50 mL 培养物(OD_{660nm}约为 1.0)2 500 r/min 离心 3 min，经无菌水洗，菌体重新悬浮于 0.35 mL 裂解缓冲液(45 mmol/L HEPES(4-(2-羟乙基)-哌嗪乙基磺酸)-KOH pH7.5，400 mmol/L 氯化钠，10% 甘油，1 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)，0.5% 乙基酚聚乙二醇醚(NP-40)，2 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)，1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF)，1 μg/mL 胃蛋白酶抑制剂，2 mmol/L 苯甲脒，1 μg/mL 抑蛋白酶肽，10 mmol/L 氟化钠)，加玻璃珠(425-600 microns)至体积为 1.2 mL，间隔振荡 3 min，上清液移至一干净 Eppendorf 管，12 000 r/min 离心 5 min，上清液转至另一 Eppendorf 管，12 000r/min 离心 15 min，上清液用 Bradford 法定蛋白量. 取同样蛋白量的酵母抽提液(体积约 150 μL)，加入 10 μL 兔抗 Pho85 抗体，冰浴 1 h，加入 30 μL 葡萄球菌蛋白 A 交联的琼脂糖珠(50% 悬液)，冰浴 1 h，间断摇匀，用 0.2 mL 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.4，含 150 mmol/L 氯化钠，0.1% NP-40，1 mmol/L 二硫苏糖醇，2 mmol/L 苯甲脒，1 μg/mL 抑蛋白酶肽，1 μg/mL 胃蛋白酶抑制剂)洗 4 次，0.2mL PBS (pH 7.4)洗 1 次，最后再用 400 μL 激酶缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)，10 mmol/L 氯化镁)洗 1 次.

1.2.6　Pho85 抗体免疫复合物的激酶活性分析　用上面制备的免疫复合物对大肠杆菌表达的 Pho4 蛋白或 GST-Pho4 融合蛋白进行^{32}P 标记，反应条件：20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)，10 mmol/L 氯化镁，10 ×3.7×10^{10}Bq[γ-^{32}P]ATP，100 μmol/LATP，亲和纯化的 GST-Pho4 蛋白(约 0.4 μg/μL)或部分纯化的 Pho4 蛋白(约 0.2 μg/μL)，反应混合物体积为 20 μL. 30℃，反应 30 min 后，离心，各取 10 μL 加相同体积的 2×SDS-PAGE 上样缓冲液，煮沸 4 min 后电泳，将凝胶抽干并压片，

1.2.7　酵母细胞的转化、酸性磷酸酯酶活力测定　参照文献[9]中的方法进行.

2　结果与讨论

2.1　用重组 Pho85 蛋白制备的多抗特异识别酵母总抽提物中的 Pho85 蛋白

PVT85 是我们先前所构建的能在 ADH 强启动子控制下表达 *pho*85 基因的质粒，它带有 Trp 选择标记，是一种高拷贝型的质粒，能较高表达 *pho*85 基因. Western blotting 的结果显示，在相应于 Pho85 蛋白约 35 ku 的位置，YPH499 野生株及 *pho*85 基因被 URA3 基因所取代的缺失株均没有可见的免疫反应条带；而 YPH499 *pho*85∶∶URA3 (含 PVT85)菌株在与 Pho85 蛋白分子量大小一致的位置有 1 条明显的免疫反应条带(图 1，第 3 道). 这一结果一方面证明了带有 PVT85 质粒的酵母中 *pho*85 基因有较高表达；另一方面也表明我们用 Pho85 包涵体为抗原制备的多抗能与酵母抽提液中的 Pho85 蛋白特异结合，为下一步进行 Pho85 蛋白的免疫沉淀提供了条件. 可能因为正常酵母

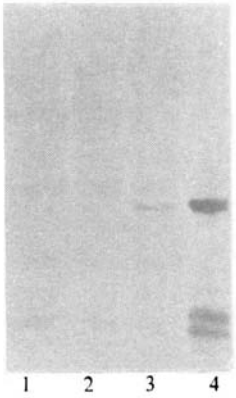

图 1　几种酵母总细胞抽提液与抗 Pho85 抗体 Western blotting 杂交结果
1 为 YPH499 *pho*85∶∶URA3，2 为 YPH499 野生株，3 为含 PVT85 质粒的 YPH499 *pho*85∶∶URA3，4 为 Pho85 包涵体

细胞 *pho*85 基因表达水平较低，YPH499 野生株总抽提物中 Pho85 蛋白的量不足以在 Western blotting 的硝酸纤维膜上显出可见的杂交信号.

2.2 *pho*80 基因的表达水平对于 Pho85 蛋白激酶活性的影响

Kaffman 等人发现用与 Pho80 蛋白特异结合的抗体在酵母抽提液中获得的免疫复合物中同时含有 Pho80 及 Pho85 蛋白，而在 *pho*80 基因缺失的酵母抽提液中用同样的抗体则不能沉淀到 Pho85 蛋白；用酵母双向杂交系统(Yeast Two-hybrid system)已证实 Pho80 与 Pho85 在细胞内存在直接的相互作用(吴建生等，未发表). 本研究用抗 Pho85 抗体分别从 *pho*80 基因缺失，*pho*80 基因正常表达或者高表达的酵母总蛋白抽提物中获得免疫复合物，在体外测定该复合物磷酸化 Pho4 的能力.

图 2 示 Pho4 蛋白和 GST-Pho4 融合蛋白的大肠杆菌表达产物. 用 P_L 启动子表达的 Pho4 蛋白已经 N 端氨基酸序列分析确定. 亲和纯化的 GST-Pho4 融合蛋白用 *pho*5 启动子作为探针进行凝胶阻抑分析，表明我们获得的融合蛋白具有 Pho4 的 DNA 结合特性. 亲和纯化时洗脱液中除表观分子量为 67 ku 的 GST-Pho4 外，还有几种小分子量的蛋白，可能是 GST-Pho4 的降解产物.

以 GST-Pho4 融合蛋白作为底物进行磷酸化分析时，作为激酶的免疫复合物中除 Pho85 外，也可能混有其它有激酶活性的蛋白，如与 Pho85 同源性较高的 $p34^{CDC28}$ 蛋白激酶，因而 *pho*80 或 *pho*85 基因缺失的酵母抽提物中得到的免疫复合物对 GST-Pho4 也有低水平的 ^{32}P 标记，可能是因其它蛋白激酶磷酸化所致. 将 *pho*80 基因编码区插入到高拷贝质粒 PVT-102 U(YEP)的 ADH 启动子下得到 PVT 80 质粒，用来转化 YPH 499 *pho*80∶∶LEU2，表达 *pho*80 基因，发现从这种酵母的总蛋白抽提液中沉淀到的 pho85 免疫复合物有较高的磷酸化 GST-Pho4 的能力(图 3，第 2 道)；而用同类表达质粒高表达 *pho*85 基因的酵母的免疫复合物

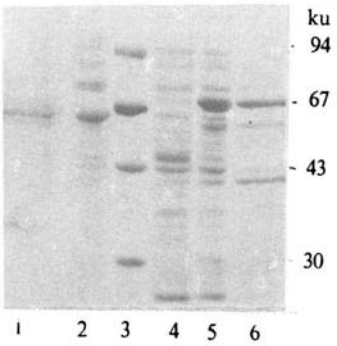

图 2 Pho4 蛋白在大肠杆菌中的表达及纯化
1 为部分纯化的 Pho4 蛋白，2 为 42℃ 热诱导后的 Pho4 表达菌 RR1(pBL*pho*4)，3 为蛋白质分子量 Marker，4 为未经 IPTG 诱导的 GST-*Pho*4 表达菌 BL21(DE3)lysS(pGEX*pho*4)，5 为 IPTG 诱导后的 GST-*pho*4 表达菌 BL21(DE3)lysS(pGEX*pho*4)，6 为亲合纯化后的 GST-Pho4 融合蛋白

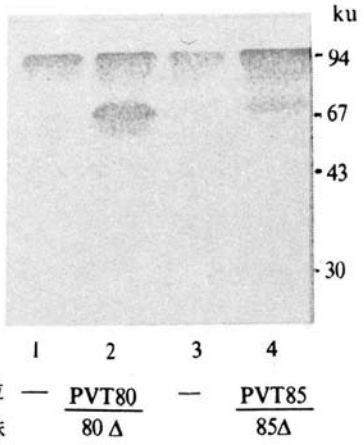

图 3 用抗 Pho85 抗体从不同酵母抽提液中获得的免疫复合物对 GST-pho4 融合蛋白的磷酸化
1 为 YPH499 *pho*80∶∶LEU2，2 为含 PVT80 质粒的 YPH499 *pho*80∶∶LEU2 菌株，3 为 YPH499 *Pho*85∶∶URA3，4 为含 PVT85 质粒的 YPH499 *pho*85∶∶URA3 菌株

磷酸化 GST-Pho4 的能力则大大低于从 *pho*80 高表达菌株中获得的免疫复合物，接近于从野生 YPH499 抽提液获得的 Pho85 免疫复合物(图 3，第 4 道).

上面的结果不能排除融合蛋白中 GST 部分被磷酸化的可能性. 我们随后用大肠杆菌表达并部分纯化的 Pho4 蛋白(非融合表达)作为磷酸化的底物，在反应条件下，发现只有在强启动子启动表达 *pho*80 基因时，Pho4 才有可见的磷酸化标记(图 4，第 4 道)；而当 *pho*80 或 *Pho*85 基因缺失时，免疫复合物不能磷酸化 Pho4，用野生 YPH499 菌株中制备的免疫复合物来磷酸化 Pho4 蛋白时，也未见标记条带(图 4，第 1，2，3 道).

图 5 是用同一批从 YPH499 *pho*80∶∶LEU2(PVT80)中制备的免疫复合物分别磷酸化 Pho4 蛋白和 GST-Pho4 融合蛋白的结果. GST-Pho4 融合蛋白在 57，42 ku 等分子量附近的条带可能是 GST-Pho4 降解而成的小片段也被磷酸化标记所致.

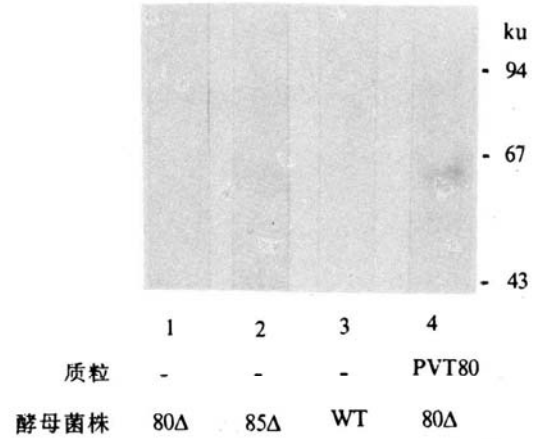

图 4　用抗 Pho85 抗体从不同酵母抽提液中获得的免疫复合物对大肠杆菌表达的 Pho4 蛋白的磷酸化

1 为 YPH499 *pho*80∶∶LEU2，2 为 YPH499 *pho*85∶∶URA3，3 为 YPH499 野生株，4 为含 PVT80 质粒的 YPH499 *pho*80∶∶LEU2 菌株

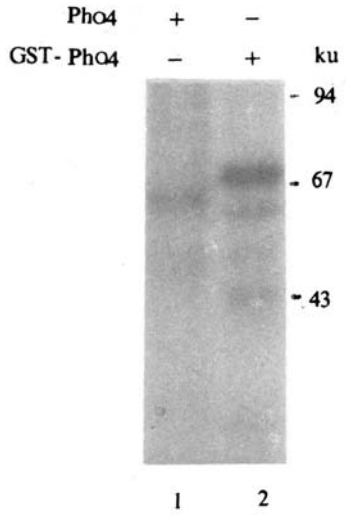

图 5　从含有 PVT80 质粒的酵母 YPH499 *pho*80∶∶LEU2 抽提液中获得的抗 *pho*85 抗体免疫复合物对大肠杆菌表达的 *pho*4 和 GST-*pho*4 的磷酸化

1 为 Pho4 蛋白作为底物，2 为 GST-Pho4 融合蛋白作为底物

从序列上看，Pho80 蛋白与蛋白激酶没有同源性，因而本身不会具备激酶活力. *pho*80 基因表达水平上的改变能在体外引起免疫复合物对 Pho4 磷酸化程度的改变，是通过与之结合的 Pho85 蛋白激酶而实现. Pho80 氨基酸序列与 cyclin 有一定的同源性，表明 Pho80 可能以类似于 cyclins 调节细胞周期相关的蛋白激酶 $p34^{cdc2/CDC28}$活力的方式，同 Pho85 蛋白激酶结合并为 Pho85 激酶活力所必须. 文献报道，野生啤酒酵母细胞内 *pho*80 基因的表达水平大大低于 *pho*85 基因的表达[10]. 增加 *pho*80 的表达能提高 Pho85 激酶的活力，这一结果也可以解释在细胞内高表达 *pho*80 基因会导致低磷培养条件(诱导条件)下酸性磷酸酯酶基因表达水平降低[11]的现象，即 *pho*80 基因的高表达导致 Pho80-Pho85 复合物对 Pho4 的磷酸化程度增加，进而影响 Pho4 激活转录的能力.

2.3 编码 cyclin 同源区的 *pho*80 基因中部序列及邻近序列的改造分析

根据 *pho*80 基因核苷酸序列推导出 Pho80 是由 293 个氨基酸组成的蛋白质，序列分析的结果显示 Pho80 蛋白从 76～187 位氨基酸序列同 2 种 cyclin：HCS26 和 OrfD 有较高同源性. 在 *pho*80 基因中部有一些限制性内切酶的切点，我们利用这些切点，通过插入限制性内切酶接头或者进行小片段缺失，对 *pho*80 基因进行改造，由于没有改变阅读框架，这些改变只会引起 *pho*80 基因编码的蛋白质在相应位点被改造. 将野生型和改造过的 *pho*80 基因(约 3.7 kb 的 Pst Ⅰ/Bgl Ⅱ 片段)以 YEplac195 质粒为载体分别转入 *pho*80 基因缺失的酶母株，测定它们在高磷培养条件下抑制酸性磷酸酯酶基因表达的能力(图 6). Madden 等曾报道 Pho80 N 端缺失 16 个氨基酸，或 C 端缺失 47 个氨基酸均不影响 Pho85 的活力[11]. 我们的结果显示，不经改造的 *pho*80 基因被转入 *pho*80 缺失株后，酸性磷酸酯酶基因的表达被抑制到只有原来活力的 4.5%，接近于野生酵母株在高磷时的水平. 而中部 cyclin 同源区被改造的 *pho*80 除 iS (第 172 位残基后插入 Glu-Phe)尚稍有抑制活力，其它改造的 *pho*80，如在第 102 位残基后插入 Ala-Gly-Ser-Arg4 个氨基酸，第 117 或 162 位残基被 Phe-Ala-Asp-Pro-Arg5 个氨基酸序列取代，则不再能抑制酸性磷酸酯酶基因的表达. 甚至在同源区邻近的第 31 位残基后插入 Ser-Gly-Ser-Ala，第 217 位残基后插入 Ala-Asp-Pro-Leu，或将第 216～225 共 10 个残基用 Ala-Asp-Pro 替代，同样会引起 Pho80 负调控作用的完全丧失. 表明在 Pho80 蛋白中部的 cyclin 同源序

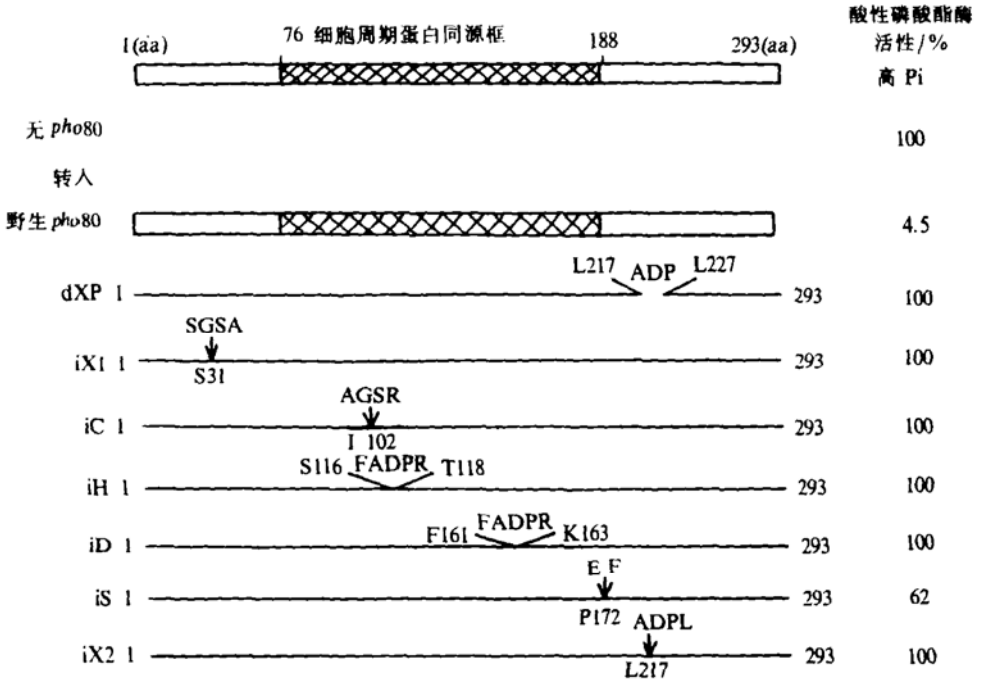

图 6 对 Pho80 中部的改造影响其在高磷条件下抑制酸性磷酸酯酶基因表达的能力

X 为 Xba Ⅰ，P 为 Pvu Ⅱ，C 为 Cla Ⅰ，H 为 Hind Ⅱ，S 为 Sac Ⅱ，D 为 Dra Ⅰ

列对 Pho80 的功能至关重要，可能该保守序列是 Pho80 形成 cyclin 特有的结构所必需，一旦被破坏，则影响其结合 Pho85 蛋白激酶的能力，或者使 Pho80 丧失激活 Pho85 蛋白激酶的能力，进而导致 Pho80-Pho85 复合物不能阻遏酸性磷酸酯酶基因的表达．在 Cyclin box 以外的 2 个位点：S31 的插入和 L217-L227 的缺失也导致 Pho80 活性的丧失，这可能由于影响了 Pho80 的其他结构域的功能．S31 处于 Pho80 与 Pho4 相互作用的功能区中，L217-L227 区的功能作用正在进行分析中，将另文报道．

参　考　文　献

1 Oshima Y. In: Strathern J N et al ed. The Molecular Biology of Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expreession. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. 159～180

2 Toh-e A, Tanaka K, Uesono Y, et al. PHO85, A negative regulator of the PHO system, is a homolog of the protein kinase gene, CDC28, of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Gen Genet 1988, 214: 162～164

3 Kaffman A, Herskowitz I, Tjian R, et al. PhosPhorylation of the transcription factor PHO4 by a cylin-CDK complex, PHO80-PHO85. Science, 1994, 263: 1 153～1 156

4 Forsburg S L, Nurse P. Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. Annu Rev Cell Biol, 1991, 7:227～256

5 Toh-e A, Ueda Y, Kakimoto S, et al. Isolation and characterization of acid Phosphatase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol, 1973, 113(2): 727～738

6 赵友阳，敖世洲．酵母 PHO4 基因的克隆和表达，生物化学杂志，1993，增刊 49

7 Smith D B, Johnson K S. Single-step purification of polypeptide expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. Gene, 1988, 67: 31～40

8 钟华琳，李伯良，敖世洲．酵母 PHO85 基因的克隆和在大肠杆菌中的高效表达．生物化学与生物物理学报，1992，24(6)：523～530

9 赵友阳，敖世洲．酵母 PHO4 基因的结构改造与功能分析，中国科学，B 辑，1994，24(11)：1 157～1 161

10 Madden S L, Johnson D L, Bergman L W. Molecular and expression analysis of the negative regulators involved in the transcriptional regulation of acid Phosphatase production in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1990, 10(11): 5 950～5 957

11 Madden S L, Creasy C L, Srinivas V, et al. Structure and expression of the PHO80 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucl Acids Res, 1988, 16(6):2 625～2 637