

• 基础实验研究论著 •

KSP1 基因参与酵母复制寿命调控机制的初步研究*

赵 炜^{1,2}, 牛宇杰^{1,2}, 袁 源^{1,2}, 刘新光^{1,2,3△}

(1. 广东医学院衰老研究所, 广东东莞 523808; 2. 广东省医学分子诊断重点实验室, 广东东莞 523808; 3. 广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 广东湛江 524023)

摘 要:目的 研究 KSP1 基因在酵母复制寿命和衰老中的作用。方法 利用基因重组原理, 构建 KSP1 基因缺失酵母菌株, 检测其复制寿命和增殖速度。结果 相对于野生酵母菌株, KSP1 基因缺失酵母菌株的复制寿命缩短, 增殖速度减慢。结论 KSP1 基因很可能参与了酵母复制寿命和衰老的调控。

关键词: KSP1; 酵母; 寿命

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 12. 001 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2014)12-1521-03

Role of KSP1 in replicative lifespan regulation of *Saccharomyces cerevisiae**

Zhao Wei^{1,2}, Niu Yujie^{1,2}, Yuan Yuan^{1,2}, Liu Xingguang^{1,2,3△}

(1. Institute of Aging Research, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China; 2. Key Laboratory for Medical Molecular Diagnostics of Guangdong Province, Dongguan, Guangdong 523808, China; 3. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524023, China)

Abstract: **Objective** To assess the role of KSP1 in replicative lifespan regulation and aging of *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods** KSP1 deletion strain was constructed by homologous recombination, then the replicative lifespan and cell proliferation ability of KSP1 deletion strain were analyzed. **Results** Lifespan was decreased and growth rate was lower in KSP1 deletion strain, compared with wild type strain. **Conclusion** KSP1 could be involved in replicative lifespan regulation of yeast.

Key words: KSP1; yeast; lifespan

酵母 KSP1 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 主要位于细胞核中, KSP1 基因对于酵母菌的营养生长来说是非必需基因^[1]。KSP1 的蛋白结构主要由两部分组成: N 端的激酶活性结构域和 C 端的天冬酰胺残基结构域。

早期的研究发现 KSP1 基因在酵母菌株生长过程中参与细胞的核转运过程, 过表达 KSP1 可以拯救酵母 *Prp20* 基因突变菌株对温度的敏感性。Prp20 本身是一种可磷酸化蛋白, 但是 KSP1 基因缺失不会影响 Prp20 的磷酸化水平^[1]。

最近的研究发现, KSP1 是细胞自噬的负调节因子, KSP1 基因缺失可以促进 Atg13 蛋白 (TORC1 的底物) 的磷酸化水平, 从而提高细胞的自噬程度。Ras/cAMP 依赖性的蛋白激酶 PKA 可以在一定程度上缓解 KSP1 对细胞自噬的抑制作用^[2-3]。

细胞自噬可以调节细胞的衰老进程, 自噬的很多调控基因都是在酵母中首次发现的^[4]。本研究以酿酒酵母作为研究对象, 初步研究 KSP1 基因在酵母复制寿命和衰老中的作用机制, 为全面研究 KSP1 基因的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 野生型二倍体酵母菌株 BY4743、载体 pRS306 由美国华盛顿大学 Matt Kaerberlein 博士赠送。La tap 酶 (货号 RR02MA) 购自 Takara; 引物合成、测序由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成引物序列, 见表 1; 其他常规试剂为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 KSP1 基因破坏元件的扩增 以质粒 pRS306 作为 PCR 模板, KSP1-URA-F、KSP1-URA-R 为引物, 扩增含有 URA3 开放阅读框的破坏元件, 全长为 1 232 bp。Taq 酶采用的是 La tap, 反应体系按照试剂说明书进行, PCR 反应条件为: 94 ℃, 1 min; 94 ℃, 30 s, 58 ℃, 30 s, 72 ℃, 1 min, 33 个循环; 72 ℃, 5 min。

表 1 扩增引物序列

引物名称	引物序列(5'~3')	序列长度 (bp)
KSP1-URA-F	GTT AGT GCA ATA TTT TTT TCT TAC	60
	AAT TTT TTG AAA CTC GAG ATT GTA	
	CTG AGA GTG CAC	
KSP1-URA-R	AAG AAA ATA ATA AGC AAC ATA ACA	60
	GAG GGA ATA GGT GCG CCT GTG CGG	
	TAT TTC ACA CCG	
KSP1-F	AGC AGT CCA CGC ATT CCG	18
KSP1-R	GAA CTG GCA GAG AGT ACA ACG AC	23

1.2.2 KSP1 基因缺失酵母菌株的构建 将 KSP1 基因破坏元件转化进野生型酵母 BY4743, 通过基因重组原理替换掉野生型酵母基因组上的 KSP1 基因^[5]。利用 URA 缺陷型培养板筛选阳性克隆。酵母感受态的制备和转化方法参考分子克

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31101051); 广东医学院博士启动项目(B2012061)。 作者简介: 赵炜, 男, 助理研究员, 主要从事细胞增殖与衰老的分子机制研究。 △ 通讯作者, E-mail: xgliu64@126.com。

隆进行^[6]。阳性克隆在液体 URA 缺陷型培养基中培养过夜,提取基因组后通过 PCR 鉴定,鉴定引物为 *KSP1*-F/*KSP1*-R, Taq 酶采用的是 La tap,反应体系按照试剂说明书进行,PCR 反应条件为:94 ℃,1 min;94 ℃,30 s,58 ℃,30 s,72 ℃,2 min,35 个循环;72 ℃,5 min。野生型对照的 PCR 产物大小为 4 380 bp,*KSP1* 基因缺失菌株的 PCR 产物大小为 2 441 bp。

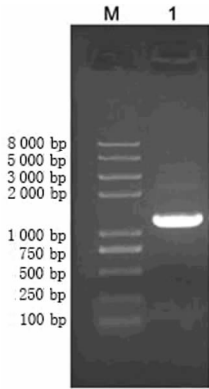
1.2.3 *KSP1* 基因缺失酵母菌株复制寿命的检测 酵母复制寿命的检测方法按照参考文献^[7]的方法进行,在显微镜下分离、统计酵母母细胞产生子细胞的个数。

1.2.4 *KSP1* 基因缺失酵母菌株生长曲线的测定 取等量 600 nm 处吸光度(A_{600})值为 0.1 的野生型酵母菌株 BY4743 和 *KSP1* 基因缺失酵母菌株 *KSP1*/*KSP1*,每个菌株重复 3 孔,同时置于 30 ℃ 恒温培养箱中振荡培养,每 2 h 测 1 次 A_{600} 。

1.3 统计学处理 统计学处理采用 SPSS11.0 软件完成,复制寿命结果以平均数表示,采用 Wilcoxon 秩和检验方法进行,比较 A_{600} 比较采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

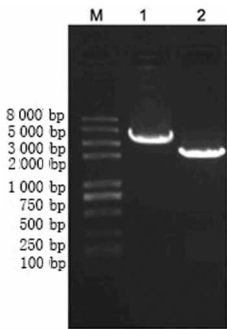
2 结 果

2.1 *KSP1* 基因破坏元件的扩增结果 *KSP1* 基因破坏元件全长为 2 714 bp,PCR 扩增产物大小经过琼脂糖凝胶电泳确认正确,见图 1。



M:DNA 标志物;1:*KSP1* 基因破坏元件 PCR 产物。
图 1 *KSP1* 基因破坏元件的扩增结果

2.2 *KSP1* 基因缺失酵母菌株的鉴定 *KSP1* 基因被 *URA3* 替换之后,利用 *KSP1* 基因编码区外侧的鉴定引物可以将野生型菌株(4 380 bp)和 *KSP1* 基因缺失酵母菌株(2 441 bp)区分,见图 2。



M:DNA 标志物;1:野生型酵母基因组 PCR 产物;2:*KSP1* 基因缺失菌株的 PCR 产物。
图 2 限制性内切酶双酶切鉴定过表达载体

2.3 *KSP1* 基因缺失菌株复制寿命的测定 本研究同时检测了野生型酵母菌株 BY4743 和 *KSP1* 基因缺失酵母菌株

KSP1/*KSP1* 的复制寿命,见图 3。结果显示,两者平均寿命分别是 35.04 代和 28.47 代,*KSP1* 基因缺失酵母菌株的复制寿命相对野生型菌株缩短了 19%,差异有统计学意义($P<0.05$)。

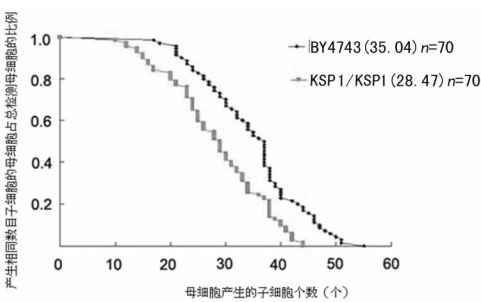


图 3 酵母菌株复制寿命检测结果

2.4 *KSP1* 基因缺失菌株生长曲线的测定 本研究同时检测了野生型酵母菌株和 *KSP1* 基因缺失酵母菌株的生长曲线,见图 4,结果显示,*KSP1* 基因缺失酵母菌株的生长速度明显低于野生型酵母菌株,差异有统计学意义($P<0.05$)。

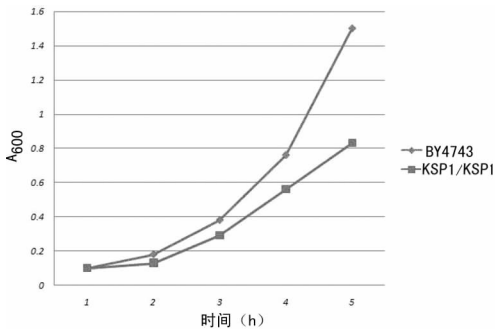


图 4 酵母菌株生长曲线

3 讨 论

酿酒酵母是单细胞生物,具有独特的单、双倍体生活特性,遗传背景清晰,易培养,生活周期短,是研究基因功能的重要模式生物,被广泛应用于衰老分子机制的研究、药物筛选等研究领域^[8]。

酿酒酵母具有 2 种细胞寿命形式:时序寿命和复制寿命^[9]。时序寿命是指在特定营养条件下一定数量处于非分裂状态的酵母细胞所能持续生存的时间。复制寿命也叫出芽寿命,酿酒酵母细胞分裂为非对称分裂,1 个母体细胞每次分裂时总是“生”出 1 个小的子代细胞。复制寿命的测定方法是用显微操作仪将酿酒酵母细胞所出的芽移走,统计母细胞在死亡之前的出芽个数。

本研究发现,*KSP1* 基因缺失酵母菌株的复制寿命和增殖速度都明显低于野生型菌株,提示 *KSP1* 基因很可能参与了酵母复制寿命的调控。*KSP1* 是细胞自噬的负调节因子,自噬是细胞利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程,是真核细胞特有的生理现象,它通过平衡细胞合成和分解代谢以稳定细胞内环境。在细胞饥饿、生长因子缺乏和缺氧等条件下,以及一些病理状态下,自噬对维持细胞的存活有积极作用^[10]。

细胞自噬与衰老及抗衰老密切相关,随着细胞的衰老,细胞自噬功能下降。研究发现大鼠长期的刺激(下转第 1525 页)

断 EV71 对宿主细胞的感染。

在目前已知的受体中,几乎全部都是宿主细胞膜相关的脂蛋白及糖蛋白,但由于这些膜蛋白的数量很少,使得分离纯化这些蛋白质变得很困难。在本实验中,成功克隆了 *scarb2* 基因,并构建了表达载体 pET28a(+)/SCARB2,用 pET28a(+)/BL21 系统大量表达了 EV71 的受体蛋白 SCARB2,使得分离微量的受体蛋白变得更容易操作。但是表达出的蛋白活性是否同天然蛋白相同,是否具有免疫原性,还有待进一步的实验证明。因此,下一步本研究组将对表达出的蛋白进行免疫原性及抗原性的鉴定,以更好地为 EV71 的感染及致病机制研究提供实验依据,为 EV71 疫苗、检测试剂盒及抗病毒药物的研制奠定基础。

参考文献

[1] Chatproedprai S, Theanboonlers A, Korkong S, et al. Clinical and molecular characterization of hand-foot-and-mouth disease in Thailand, 2008—2009[J]. Jpn J Infect Dis, 2010, 63(4): 229-233.

[2] Blomqvist S, Klemola P, Kajjalainen S, et al. Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland[J]. J Clin Virol, 2010, 48(1): 49-54.

[3] Chen P, Song Z, Qi Y, et al. Molecular determinants of enterovirus 71 viral entry: cleft around GLN-172 on VP1 protein interacts with variable region on scavenge receptor B 2[J]. J Biol Chem, 2012, 287(9): 6406-6420.

[4] Reczek D, Schwake M, Schröder J, et al. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of β -glucocerebrosidase[J]. Cell, 2007, 131(4): 770-783.

[5] Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, et al. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71[J]. Nat Med, 2009, 15(7): 798-801.

[6] Schuffenecker I, Mirand A, Antona D, et al. Epidemiology of human enterovirus 71 infections in France, 2000—2009[J]. J Clin Virol, 2011, 50(1): 50-56.

[7] Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, et al. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71[J]. Nat Med, 2009, 15(7): 794-797.

[8] Nilsson EC, Jamshidi F, Johansson SMC, et al. Sialic acid is a cellular receptor for coxsackievirus A24 variant, an emerging virus with pandemic potential[J]. J Virol, 2008, 82(6): 3061-3068.

[9] Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H. Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection[J]. PLoS Pathog, 2010, 6(11): e1001174.

[10] Yamayoshi S, Koike S. Identification of a human SCARB2 region that is important for enterovirus 71 binding and infection[J]. J Virol, 2011, 85(10): 4937-4946.

[11] Patel KP, Bergelson JM. Receptors identified for hand, foot and mouth virus[J]. Nat Med, 2009, 15(7): 728-729.

(收稿日期: 2014-02-12)

(上接第 1522 页)

自噬可延缓衰老的进程。西罗莫司靶向(Tor)激酶是一种抑制自噬途径的重要因子, Tor 激酶抑制剂西罗莫司在酵母和哺乳动物细胞中都可以促进自噬基因 *ATG8* 转录水平的提高^[11-12]。

研究发现低浓度的西罗莫司可以通过刺激酵母自噬的增强来延长酵母的时序寿命。本文的研究发现, 尽管 *KSP1* 基因作为细胞自噬的负调控因子, 但是 *KSP1* 基因缺失并没有延长酵母的复制寿命, 很可能是因为 *KSP1* 缺失虽然可以增加酵母自噬能力, 但是同时也会影响其他未知基因的功能, 进而导致酵母细胞复制寿命的缩短, 其中的机制需要进一步研究。

参考文献

[1] Fleischmann M, Stagljar I, Aebi M, et al. Allele-specific suppression of a *Saccharomyces cerevisiae* prp20 mutation by overexpression of a nuclear serine/threonine protein kinase[J]. Mol Gen Genet, 1996, 250(5): 614-625.

[2] Umekawa M, Klionsky DJ. *KSP1* kinase regulates autophagy via the target of rapamycin complex 1 (TORC1) pathway[J]. J Biol Chem, 2012, 287(20): 16300-16310.

[3] Laxman S, Tu BP. Multiple TORC1-associated proteins regulate nitrogen starvation-dependent cellular differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26081.

[4] Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes[J]. Dev Cell, 2003, 5(4): 539-545.

[5] 奥斯伯. 精编分子生物学实验指南[M]. 4 版. 马学军, 译. 北京: 科学出版社, 2005: 577-578.

[6] 方炳雄, 赵炜, 崔红晶, 等. 酿酒酵母寿命的研究方法及进展[J]. 国际老年医学杂志, 2013, 34(1): 28-34.

[7] Steffen KK, Kennedy BK, Kaerberlein M. Measuring replicative life span in the budding yeast[J]. J Vis Exp, 2009(28): 1209.

[8] Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span from yeast to humans[J]. Science, 2010, 328(5976): 321-326.

[9] Steinkraus KA, Kaerberlein M, Kennedy BK. Replicative aging in yeast: the means to the end[J]. Ann Rev Cell Dev Biol, 2008, 24: 29-54.

[10] Sampaio-Marques B, Felgueiras C, Silva A, et al. Yeast chronological lifespan and proteotoxic stress: is autophagy good or bad[J]. Biochem Soc Trans, 2011, 39(5): 1466-1470.

[11] Gelino S, Hansen M. Autophagy—an emerging anti-aging mechanism[J]. J Clin Exp Pathol, 2012, Suppl 4: 6.

[12] Alvers AL, Wood MS, Hu D, et al. Autophagy is required for extension of yeast chronological life span by rapamycin[J]. Autophagy, 2009, 5(6): 847-849.

(收稿日期: 2014-01-16)