

## 酵母表达系统在植物功能基因组学研究中应用的局限性

潘维锋 李师鹏\*

山东师范大学生命科学学院, 济南 250014

### Yeast, a Model System to Elucidate Plant Gene Function: Application and Limitation

PAN Wei-Feng, LI Shi-Peng\*

College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China

**摘要** 介绍了酵母表达体系在植物的功能基因组学中的应用, 并对这一实验手段应用的局限性进行了分析, 以期提醒研究者应全面理解采用这一体系所获得的实验数据, 确保据此而作出的结论全面、可靠。

**关键词** 酵母; 拟南芥; 基因组学; 酵母功能互补; 功能基因组学

随着 DNA 测序技术的不断完善, 基因测序变得越来越经济、有效、可靠。到 2006 年 6 月为止已经完成包括酵母、人类、拟南芥在内的 21 个真核生物基因组测序, 另外还有 126 个真核生物基因组计划正在进行中(数据来源于 NCBI 数据库)。这些前沿性工作导致了大量新基因的发现, 为人们在基因组水平上研究生物的生长和发育等生命现象打下了基础。单倍体啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是 1997 年完成全基因组测序的, 这是第一个完成的全基因组测序的真核生物。整个酵母基因组包括约 6 200 个不含内含子的基因。其中很多基因的功能已得到较为深入的研究, 有关信息可以通过互联网在酵母基因组数据库中查到, 如斯坦福大学的 SGD (Saccharomyces Genome Database) 数据库。迄今, 整个酵母的 95% 以上的基因序列被系统敲除, 不同的单基因敲除突变体可以从 Invitrogen 公司 ATCC (American Type Culture Collection) 或 EUROSCARF (European *Saccharomyces cerevisiae* Archives for Functional Analysis) 获得。

作为单细胞真核生物, 酵母细胞较容易用来表达其他真核生物的蛋白, 用于蛋白质的亚细胞定位和后期蛋白生物活性的分析; 同时, 作为最早进行功能基因组研究的真核生物, 酵母丰富的信息可以为其他真核生物功能基因组研究提供参考。事实上, 不断完善的酵母研究体系大大促进了包括植物在内的功能基因组学的研究进展。

本文介绍酵母表达体系在植物基因的功能基因组研究中的应用, 并对应用这一表达体系的局限性作了分析。

#### 1 酵母表达体系的优点

酵母表达体系具有许多优点: (1) 作为真核细胞表达体系, 酵母与体外培养的动物、植物细胞相比, 具有操作简单易行、培养周期较短的特点; (2) 相对简便成熟的遗传操作技术, 可以有效地产生丰富多样的酵母突变体; (3) 较为完善的表达控制系统, 如 *PMA1* 和 *PDR5* 等强启动子可以介导目的蛋白高水平表达, 表达蛋白的丰度可以达到膜蛋白的 10%; 此外, 采用诱导表达启动子可以在时间上严格控制目的蛋白的表达, 如 *GALI-10* (半乳糖诱导)、*PHO5* (胞外无机磷诱导) 和 *HSE* (37°C 温度诱导)。正是由于有这些优点, 使酵母功能基因组的研究得以走在生物功能基因组研究的前列。

由于生物基因功能进化上的保守性, 使酵母表达系统也可广泛用于研究其他生物系统功能基因组的功能。譬如细菌 (Morsomme 等 2002)、原生动物 (Bhattacharyya 等 2002; Burchmore 等 2003)、真菌 (Zwiers 等 2003)、动物 (Ton 等 2002) 和植物 (Minet 等 1992; Liang 等 1997)。

收稿 2006-08-14 修定 2006-10-23

\*通讯作者 (E-mail: lishipeng@ibcas.ca.cn, Tel: 0531-85778862)。

## 2 酵母体系在真核生物功能基因组研究中的应用

**2.1 表达异源蛋白** 除了满足生化分析的材料要求外, 还可为目的蛋白功能研究提供直接试验依据。酵母体系用于外源蛋白的表达源于20世纪80年代, 与细菌相比, 酵母体系可以将表达的异源蛋白(exogenous protein)定位到细胞内的膜结构上, 从而易于后期对蛋白生物化学活性进行分析。这一技术对于用传统的生物化学技术很难分离的运输蛋白和通道蛋白特别有效。例如, 多重耐药性(MDR multidrug resistance)基因最早发现于动物细胞, 它编码膜转运蛋白, 介导脂溶性药物向膜外的主动转运。拟南芥基因组编码多个与动物MDR同源的基因, 其中 *AtMDR1* 突变体呈现为或显示为生长素运输障碍表型。Noh等(2001)将 *AtMDR1* 基因导入酵母表达载体(p426ADH), 并用这一研究体系发现, 酵母细胞表达的AtMDR1可以特异性地与生长素运输抑制剂萘基邻氨基甲酸苯甲酸(NPA naphthylphalamic acid)结合, 显示AtMDR1可能通过与NPA的作用在生长素极性转运过程中发挥调节作用。这一工作是对AtMDR1的功能研究中的直接实验依据。

建立一个成功的异源酵母蛋白表达系统并不是轻而易举的。由于酵母的糖基修饰机制和蛋白分拣机制与植物细胞不同, 如果某蛋白的糖基化对其功能至关重要, 那么采用酵母体系获得的此种蛋白将会失去生物活性。另外, 如果外源蛋白在内质网中折叠较慢或发生折叠错误, 合成的蛋白将会在内质网内滞留, 外源蛋白的累积可能会对细胞产生毒性, 从而导致细胞缓慢生长甚至死亡。错误折叠的外源蛋白同时也会激活细胞的降解机制, 导致蛋白降解, 在这种情况下, 将很难获得高表达量的蛋白质(Kauffman等2002)。

**2.2 新基因的克隆及其产物的亚细胞定位** 由于某些生化过程或代谢途径在进化上是高度保守的, 因此, 用植物基因与特定的酵母突变体进行互补试验, 根据互补表型, 采用一定的酵母突变体筛选植物的不同cDNA文库, 鉴定参与某一生化过程或代谢途径的有关基因, 这一方法已经广泛应用于植物基因功能的研究。譬如, 采用K<sup>+</sup>吸收的酵母缺陷型突变体, 在拟南芥中筛选到了3个可能的编码K<sup>+</sup>转运蛋白的基因: *AKT1* (Sentenac

等1992)、*KAT1* (Anderson等1992)和*HKT1* (Schaechtman和Schroeder 1994); *KAT*与*AKT1*序列相似但非等位, 而*HKT1*同*AKT1*和*KAT1*都没有相似性。同样地, 用酵母的2种不同氨基酸转运缺陷突变体筛选拟南芥cDNA文库, Frommer等(1993)和Hsu等(1993)成功地克隆到相应的编码相同氨基酸透过酶的植物基因(*NAT2/AAP1*), 两者与酵母的同源基因相比, 在序列上虽毫无相似之处, 但它们编码的蛋白显然具有相同的运输功能。毫无疑问, 酵母细胞为研究这些转运蛋白的转运机制提供了一个很好的研究体系。但是, 我们应当意识到, 在植物细胞中, 这些转运蛋白的活性可能受到另外一些与酵母不同的蛋白因子调节, 基因的表达在时空上受到更加严格的调控, 所以, 这就决定了它们功能上具有的一些与酵母不同的特异性。另外, 与酵母细胞不同, 植物细胞具有发达的内膜系统, 植物转运蛋白除了主要分布在细胞膜上以外, 还有相当一部分蛋白分布在细胞内部结构的膜系统上, 当它们在酵母中表达时, 这些本来分布在内膜系统的蛋白就可能定位到酵母的质膜上去。譬如, 在酵母细胞中EX070P分布在细胞质膜上, 我们采用绿色荧光蛋白(GFP)标记拟南芥基因组中与酵母exo70p同源的AtExo70-20蛋白时, 发现该蛋白并没有分布在质膜上, 而是分布在核周质区域的膜结构上(未发表数据)。

**2.3 同源基因的功能确定** 除了采用酵母突变体在植物中克隆具有特定功能的未知基因外, 也可以根据序列相似性, 或用植物基因与相应的酵母功能缺陷突变体互补, 确定某一基因的生物功能。很多植物蛋白能够和酵母突变体进行功能上的互补, 从而为未知功能基因的研究提供最初的实验依据。酵母的互补试验是阐述这些基因功能的一个有效手段。例如, 根据序列相似性, 人们克隆到了与酵母*Nhx1*同源的拟南芥基因*AtNHX1* (Apse等1999; Gaxiola等1999), 该基因编码Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交换蛋白基因家族的一个成员。在酵母中, *Nhx1*蛋白定位于原液泡区隔内(PVC prevacuolar compartment), 它与Na<sup>+</sup>介导的植物盐耐受性有关。酵母互补实验证明*AtNHX1* cDNA可以互补酵母*nhx1*突变体的部分表型(Gaxiola等1999), 在拟南芥中过量表达*AtNHX1*时, 转基因植物也

会获得一定的耐盐性(Apse等1999)。此方法还成功地用于分离拟南芥中参与笼形蛋白包被囊泡向液泡转运有关的相关基因, 或用来检测同源的拟南芥基因功能。如Sar1p和Sec12p(参与ER-to-Golgi转运途径, d'Enfert等1992), Pep12p(SNAP受体蛋白, 与细胞分泌过程中的膜融合有关)(Bassham等1995)。

### 3 在酵母中表达的植物蛋白其分布和功能的可能变化

在细胞中, 一个成熟的蛋白要发挥作用, 常常是与其他蛋白相互作用的。与植物细胞相比, 酵母细胞具有特异的组织结构形式、蛋白分拣机制和不同的生命活动调节方式。这些不同可能会造成异源表达的蛋白在分布和功能上发生变化。因此, 如此之多的拟南芥基因能够成功地互补酵母细胞突变体, 不能不让人产生疑问, 即仅用酵母互补的数据来确定植物蛋白的功能, 可能有些草率。

事实上, 越来越多的证据显示, 在酵母和植物细胞中, 某些蛋白功能和亚细胞定位并不是对应的。例如, 采用酵母 *vam3* 突变体互补时, 人们已克隆到拟南芥 *AtVAM3* 基因(Sato等1997)。酵母的 *VAM3P* 是一个 t-SNARE 蛋白, 分布在液泡膜上, 介导转运囊泡与液泡膜的融合。拟南芥 *AtVAM3* 最初认为分布在茎尖分生组织的液泡膜上(Sato等1997), 但后来采用免疫电镜和梯度密度离心分离细胞组分技术研究这一问题时发现, 在拟南芥的根和叶细胞中, *AtVAM3* 并没有分布在液泡膜上, 而是和 *AtPEP12* 一起分布在原液泡区隔内。据此推测, 拟南芥 *AtVAM3* 与酵母 *VAM3P* 不同, 至少在根和叶中该蛋白参与从高尔基体反式管网结构TGN(trans-Golgi network)到原液泡区隔的囊泡转运过程, 或者参与原液泡间的融合过程, 而与原液泡区隔到液泡的转运途径无关(Sanderfoot等1999)。*AtVAM3* 之所以能互补酵母 *vam3*, 可能是 *AtVAM3* 在酵母细胞中表达会导致异位表达的蛋白错误地定位到液泡膜上的缘故。

在研究植物细胞分泌过程中, 人们还发现酵母的一个基因常常与多个拟南芥基因相对应。如酵母 V-SNARE 基因 *VTI1*, 该基因在酵母基因组中只有一个拷贝, 但有报道认为 *VTI1* 蛋白具有多

重功能, 参与多个转运途径中的囊泡融合过程。酵母中已发现多个 *VTI1* 等位突变体, 不同等位突变只影响某一特异的转运途径, 而对其他途径没有影响。拟南芥基因组中有 2 个基因(*AtVTI1a* 和 *AtVTI1b*)与酵母 *VTI1* 有关。以酵母所作的试验表明, 这 2 个基因编码的蛋白可以互补不同的 *VTI1* 等位突变体, 说明这 2 个植物蛋白被特异化为只具有部分酵母 *Vti1p* 蛋白的功能, 分别在 2 个不同的转运途径中发挥作用(Zheng等1999b)。另外一个例子是 *Vps45p* 蛋白(与 *Sec1p* 蛋白相似)。在酵母细胞中该蛋白参与 2 条通向液泡的转运途径: 羧肽酶 Y 途径和胞质到液泡途径。在羧肽酶 Y 途径中, *Vps45p* 与原液泡 t-SNARE *Pep12p* 蛋白作用, 参与源于反式高尔基管网结构(TGN)的转运囊泡与原液泡区隔的融合; 在胞质到液泡途径中, 该蛋白与反式高尔基管网结构中 t-SNARE *Tlg2p* 蛋白作用, 与此结构中的转运中间体形成有关。现已查明, 拟南芥 cDNA 编码的一个蛋白 *AtVPS45* 与酵母 *Vps45p* 具有高度的同源性, 该蛋白在酵母表达时可与 *vps45* 突变体缺陷表型互补(Bassham和Raikhel1998)。在拟南芥中还看到, *AtVPS45* 只分布在反式高尔基管网结构中, 只同分布在这一结构上的 t-SNARE 蛋白发生作用, 而在原液泡区隔中没有分布, 因此不可能与原液泡区隔中 tSNARE 结合(Bassham和Raikhel2000)。显然, *AtVPS45* 在酵母细胞中表达时, 也参与囊泡和前液泡结构的融合过程, 而在植物细胞中, 这一功能则由其他蛋白承担, 但此种蛋白迄今尚未发现。酵母 *PEP12* 基因是另外一个例子, 该基因在拟南芥基因组中至少有 3 个与之序列非常相近的基因: *AtPEP12* (Bassham等1995)、*AtVAM3* (Sato等1997)和 *AtPLP* (Zheng等1999a)。这些不同的基因是否有不同功能, 或者这些基因的功能是冗余的(redundant), 目前尚不清楚。但已有实验显示, 至少 *AtPEP12* 和 *AtVAM3* 在功能上并不是冗余的。

尽管目前已经有了比较完善的酵母表达体系, 但仍有相当一部分异源蛋白在酵母表达时常不能得到理想的结果, 甚至产生一些假象。例如, 采用酵母互补系统研究植物液泡膜受体的工作并不乐观, 虽然早些时候发现植物 *VSR<sub>ps-1</sub>* 可

以部分互补酵母 *vsp10p* 的表型 (Humair 等 2001)。但最近有研究认为植物 VSRs 在酵母细胞中不能为其蛋白分拣机制识别 (Shimada 等 2003; Hernández 等 2005)。

#### 4 结语

综上所述, 酵母细胞有其特异性, 所以不应简单地认为植物细胞是绿色酵母细胞。当植物蛋白在酵母体系中表达时, 特别是采用多拷贝载体在酵母中进行过量表达时, 外源蛋白并不总是定位在其应在的亚细胞结构上。植物蛋白在酵母表达时的分布模式和功能并不总是反映其在植物细胞中的真实情况, 因此, 仅仅依据酵母互补的实验数据来确定植物蛋白在植物细胞中的定位和功能是不够的。酵母互补试验只是基因功能研究的第一步, 要想得到科学的结论, 还应当尽可能多的与植物细胞的数据结合起来进行综合分析。采用酵母表达系统研究植物基因的功能, 虽然是植物功能基因组学研究中的有效方法, 但有其局限性。本文列举的事例并不是想否定酵母试验的结果, 而是想提醒研究者应更全面的理解采用酵母这一表达体系所获得的数据, 以求能得出更为科学和可靠的结论。

#### 参考文献

- Anderson JA, Huprikar SS, Kochian LV, Lucas WJ, Gaber RF (1992). Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA, 89: 3736~3740
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Arabidopsis*. Science, 285: 1256~1258
- Bassham DC, Gal S, Conceição AS, Raikhel NV (1995). An *Arabidopsis* syntaxin homologue isolated by functional complementation of a yeast *pep12* mutant. Proc Natl Acad Sci USA, 92: 7262~7266
- Bassham DC, Raikhel NV (1998). An *Arabidopsis* VPS45p homolog implicated in protein transport to the vacuole. Plant Physiol, 117: 407~415
- Bassham DC, Raikhel NV (2000). Plant cells are not just green yeast. Plant Physiol, 122: 999~1001
- Bhattacharyya MK, Hong Z, Kongkasuriyachai D, Kumar N (2002). *Plasmodium falciparum* protein phosphatase type 1 functionally complements a *glc7* mutant in *Saccharomyces cerevisiae*. Int J Parasitol, 32: 739~747
- Burchmore RJ, Wallace LJ, Candlish D, Al-Salabi MI, Beal PR, Barrett MP, Baldwin SA, de Koning HP (2003). Cloning, heterologous expression, and *in situ* characterization of the first high affinity nucleobase transporter from a protozoan. J Biol Chem, 278: 23502~23507
- d'Enfert C, Gensse M, Gaillardin C (1992). Fission yeast and a plant have functional homologues of the Sar1 and Sec12 proteins involved in ER to Golgi traffic in budding yeast. EMBO J, 11: 4205~4211
- Frommer WB, Hummel S, Riesmeier JW (1993). Expression cloning in yeast of a cDNA encoding a broad specificity amino acid permease from *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA, 90: 5944~5948
- Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL, Fink GR (1999). The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. Proc Natl Acad Sci USA, 96: 1480~1485
- Hernández DH, Paris N, Neuhaus, JM, Deloche O (2005). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is not an efficient tool for *in vivo* studies of plant vacuolar sorting receptors. Plant Cell, 17: 1339~1342
- Hsu LC, Chiou TJ, Chen L, Bush DR (1993). Cloning a plant amino acid transporter by functional complementation of a yeast amino acid transport mutant. Proc Natl Acad Sci USA, 90: 7441~7445
- Humair D, Hernandez FD, Neuhaus, JM, Paris N (2001). Demonstration in yeast of the function of BP-80, a putative plant vacuolar sorting receptor. Plant Cell, 13: 781~792
- Kauffman KJ, Pridgen EM, Doyle 3rd FJ, Dhurjati PS, Robinson AS (2002). Decreased protein expression and intermittent recoveries in BiP levels result from cellular stress during heterologous protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Prog, 18: 942~950
- Liang F, Cunningham KW, Harper JF, Sze H (1997). ECA1 complements yeast mutants defective in Ca<sup>2+</sup> pumps and encodes an endoplasmic reticulum-type Ca<sup>2+</sup>-ATPase in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA, 94: 8579~8584
- Minet M, Dufour ME, Lacroute F (1992). Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNA. Plant J, 2: 417~422
- Morsomme P, Chami M, Marco S, Nader J, Ketchum KA, Goffeau A, Rigaud JL (2002). Characterization of a hyperthermophilic P-type ATPase from *Methanococcus jannaschii* expressed in yeast. J Biol Chem, 277: 29608~29616
- Noh B, Murphy AS, Spalding EP (2001). Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. Plant Cell, 13: 2441~2454
- Sanderfoot AA, Kovaleva V, Zheng H, Raikhel NV (1999). The t-SNARE AtVAM3p resides on the prevacuolar compartment in *Arabidopsis* root cells. Plant Physiol, 121: 929~938
- Sato MH, Nakamura N, Ohsumi Y, Kouchi H, Kondo M, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Wada Y (1997). The *AtVAM3* encodes a syntaxin-related molecule implicated in the vacuolar assembly in *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem, 272: 24530~24535
- Schachtman DP, Schroeder JI (1994). Structure and transport

- mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature*, 370: 655~658
- Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, Lacroute F, Salmon JM, Gaymard F, Grignon C (1992). Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science*, 256: 663~665
- Shimada T, Fuji K, Tamura K, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2003). Vacuolar sorting receptor for seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 16095~16100
- Ton VK, Mandal D, Vahadji C, Rao R (2002). Functional expression in yeast of the human secretory pathway  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ -ATPase defective in Hailey-Hailey disease. *J Biol Chem*, 277: 6422~6427
- Zheng H, Bassham DC, Conceição AS, Raikhel NV (1999a). The syntaxin family of proteins in *Arabidopsis*: A new syntaxin homologue shows polymorphism between two ecotypes. *J Exp Bot*, 50: 915~924
- Zheng H, von Mollard GF, Kovaleva V, Stevens TH, Raikhel NV (1999b). The plant vesicle-associated SNARE AtVTI1a likely mediates vesicle transport from the *Trans*-Golgi network to the prevacuolar compartment. *Mol Biol Cell*, 10: 2251~2264
- Zwiers LH, Stergiopoulos I, Gielkens MM, Goodall SD, de Waard MA (2003). ABC transporters of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* function as protectants against biotic and xenobiotic toxic compounds. *Mol Genet Genomics*, 269: 499~507