

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.01030

裂殖酵母 Cnb1 参与胞质分裂过程

范洁琼, 邓小龙, 冯碧薇, 王继峰, 余焱, 吕红

复旦大学生命科学学院, 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433

摘要: 丝/苏氨酸特异性钙调磷酸酶(Calcineurin, CN)是一种在真核生物中广泛存在的蛋白, 是参与转录调控的重要分子。裂殖酵母中的 CN 是由催化亚基 Ppb1 和调节亚基 Cnb1 组成的异源二聚体。文章报道了裂殖酵母中 *cnb1*⁺ 的缺失引起细胞生长速度缓慢, 产生多隔膜现象, 胞质分裂受阻滞。胞质分裂过程中, Cnb1 与 Ppb1 组成 CN 复合物, 与收缩环在分裂平面上共定位, 并与收缩环一起收缩。*cnb1Δ* 菌株的隔膜成熟过程存在缺陷, 微管出现纵穿隔膜的现象。上述结果说明 Cnb1 可能参与隔膜的成熟过程。此外, 还检测了 *cnb1Δ* 菌株中胞裂蛋白的信号。胞裂蛋白包括 Spn1、Spn2、Spn3 和 Spn4, 它们是引导隔膜降解的重要分子。结果显示, 在 *cnb1Δ* 菌株中, 80%左右的细胞在隔膜处缺失 Spn2 和 Spn3 的信号, 20%左右的细胞缺失 Spn1 和 Spn4 的信号。由于胞裂蛋白的蛋白表达量在 *cnb1Δ* 中没有降低, 因此胞裂蛋白信号的消失不是转录缺陷引起的, 这暗示 Cnb1 可能采用了不依赖转录的方式来调控胞裂蛋白环的稳定性。以上结果提示, Cnb1 可能通过影响隔膜的成熟及胞裂蛋白环的稳定性参与调节裂殖酵母的胞质分裂过程。

关键词: 裂殖酵母; Cnb1; 胞质分裂; 胞裂蛋白; 收缩环

Cnb1 involved in cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*

FAN Jie-Qiong, DENG Xiao-Long, FENG Bi-Wei, WANG Ji-Feng, YU Yao, LV Hong

State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract: Serine/Threonine-specific calcineurin (CN) is highly conserved in eukaryotes, which plays an important role in transcriptional regulation. In *Schizosaccharomyces pombe*, CN exists as a heterodimer composed by catalytic subunit Ppb1 and regulatory subunit Cnb1. Deletion of *cnb1*⁺ reduced the growth rate of cells, and caused a chained phenotype, and had delay in cytokinesis. In cytokinesis, Cnb1 could form CN complex with Ppb1 and could colocalize and constrict with the contractile ring at division plane. Tubulin could cross the septum in *cnb1Δ* strain, suggesting that the septum is not fully matured. These results suggest Cnb1 might be involved in maturation of septum. The signals of septins in *cnb1Δ* strain were also analyzed. Septins include Spn1, Spn2, Spn3, and Spn4. Septins help to guide hydrolytic enzymes for septum degradation. Eighty percent of *cnb1Δ* cells lacked the signals of Spn2 or Spn3 at septum, and twenty percent of *cnb1Δ* cells lacked the signals of Spn1 or Spn4 at septum. The reduction of the septin signals was not due to impaired transcription of septins,

收稿日期: 2013-03-05; 修回日期: 2013-04-19

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(编号: 2009CB825601)和国家自然科学基金项目(编号: 31200961)资助

作者简介: 范洁琼, 硕士研究生, 专业方向: 遗传学。E-mail: 10210700045@fudan.edu.cn

通讯作者: 吕红, 博士, 教授, 研究方向: 微生物遗传学。E-mail: honglv@fudan.edu.cn

网络出版时间: 2013-6-13 17:55:16

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130613.1755.002.html>

since the protein levels of septins in the *cnb1Δ* cells were not decreased. These results imply that Cnb1 might regulate the stability of septin ring in a transcription-independent manner. In general, our study showed that Cnb1 contributes to the maturation of septum and the stability of septin ring and is important in the cytokinesis.

Keywords: *Schizosaccharomyces pombe*; Cnb1; cytokinesis; septin; contractile ring

细胞核分裂完成后, 单个细胞分裂成两个子细胞的过程称为胞质分裂(Cytokinesis)。它是细胞周期中的最后一个事件。胞质分裂需要解决两个问题: 一个是空间问题, 细胞必须在垂直于染色体分离平面的位置上进行分裂; 另一个是时间问题, 胞质分裂必须发生在有丝分裂的最后时期^[1]。在裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)中, 细胞分裂的位置由 Mid1 蛋白标定。在细胞分裂间期, Mid1 蛋白离开细胞核, 移动到细胞中央, 在靠近细胞膜的位置发生聚集, 从而标定了细胞分裂的位置^[2,3]。随后, 一系列蛋白在 Mid1 的基础上, 被依次征集到分裂位置, 构成了收缩环(Contractile ring)。这些蛋白包括肌动蛋白、肌球蛋白、Rng2、Cdc15、Cdc12 和 Cdc3 等^[4-6]。收缩环成熟后, 胞裂蛋白(Septin)与 Mid2 在收缩环的外侧形成另一个环状结构——胞裂蛋白环(Septin ring)^[7,8]。胞裂蛋白环上的胞裂蛋白包括 Spn1、Spn2、Spn3 和 Spn4^[9]。起始分隔网络(Septation initiation network, SIN)途径负责启动收缩环的收缩^[1]。收缩环的收缩引起细胞膜内陷, 与此同时, 细胞合成新的细胞壁, 在细胞分裂的位置形成隔膜(Septum)。最后, 在胞裂蛋白环的引导下, 隔膜降解酶 Eng1 和 Agn1 被征集到隔膜处。这些隔膜降解酶以向心的方式降解隔膜, 使一个细胞分裂成两个子细胞, 完成胞质分裂过程^[10]。

丝/苏氨酸特异性钙调磷酸酶(Calcineurin, CN)是一种在真核生物中广泛存在的蛋白分子^[11, 12], 是由催化亚基和调节亚基组成的异源复合物^[13]。CN 通过去磷酸化的方式调节转录因子的活性, 受到调节的转录因子包括人活化 T 细胞核因子 NFAT、酿酒酵母 CDRE 驱动转录的调节因子 Crz1p^[14]和裂殖酵母 Ppb1 应答锌指蛋白 Prz1^[15]等。这些转录因子激活后调控下游目标基因的转录, 从而参与疾病调节、压力应答和离子稳态等生命活动^[15-21]。

在 *S. pombe* 中, *cnb1*⁺编码 CN 的调节亚基,

ppb1⁺编码 CN 的催化亚基。Cnb1 是 CN 发挥完全酶活所必需的。在通常情况下, Ppb1 的磷酸酶活性受到抑制。在 Ca²⁺的刺激下, 钙调蛋白(Calmodulin, CaM)被激活, 激活后的钙调蛋白与 CN 结合, 从而激活 CN 的磷酸酶活性^[22]。在此过程中, Cnb1 主要通过改变复合物的构象实现对 CN 活性的调节, 若缺失 *cnb1*⁺, CN 只能发挥部分活性^[23]。但是, 在 *S. pombe* 中, 已报道的 CN 生物学功能主要以催化亚基 Ppb1 为研究对象获得的。如通过持续激活的 Ppb1 突变体(Ppb1ΔC)对 SIN 途径的突变体补偿现象, 推断 CN 可以正调控 SIN 途径, 并参与隔膜的成熟过程^[24]。通过 *ppb1Δ* 与磷脂酰肌醇-4-磷酸 5-激酶(PI(4)P5K)的突变体合成致死表型, 结合 PI(4)P5K 在隔膜处的定位对胞质分裂的调节作用, 推断 Ppb1 会与 PI(4)P5K 一起调节细胞分裂过程^[25]。由于 Cnb1 是 CN 的调节亚基, 通常认为 Cnb1 仅起辅助作用, 所以针对 Cnb1 研究很少。已有的报道表明, Cnb1 分布在细胞核及细胞质中^[26], Cnb1 参与 CN 酶活的调节, 并且是免疫抑制剂复合物 FKBP12-FK506 在体内的药理学靶标^[27]。本研究致力于探索 Cnb1 的其他功能, 尤其是在胞质分裂中的功能。

本研究发现 *cnb1*⁺的缺失引起细胞生长缓慢, 并出现多隔膜和隔膜降解滞后的现象。荧光定位分析发现, 在胞质分裂过程中, Cnb1 定位在分裂平面上, 并与收缩环共同收缩。在 *cnb1Δ* 中, 微管能够纵穿隔膜, 说明隔膜不完全成熟。这些结果提示 Cnb1 可能与收缩环一样, 参与调控隔膜的成熟过程。此外, 本研究还在 *cnb1Δ* 中检测了胞裂蛋白在隔膜处的定位情况。结果显示 80%左右的细胞在隔膜处缺失 Spn2 和 Spn3 的信号, 20%左右的细胞缺失 Spn1 和 Spn4 的信号。由于胞裂蛋白的蛋白表达量在 *cnb1Δ* 中没有降低, 因此胞裂蛋白信号的缺失不是转录缺陷引起的, 这暗示 Cnb1 可能采用了不依赖转录的方式来调控胞裂蛋白环的稳定性。综上所述,

我们认为 Cnb1 是胞质分裂中的重要蛋白, 它参与了隔膜成熟过程及胞裂蛋白环的稳定性维持。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究所用裂殖菌株如表 1 所示。大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 菌株为本实验室保存。裂殖酵母基因同源敲除质粒 CHGL、红色荧光整合质粒 FAML、FAMU 均为本实验室构建及保存。3 种质粒均通过改造 pCloneHyg1^[28] 质粒获得, 分别带有潮霉素抗性序列 (Hyg^R)、*leu1*⁺ 筛选标记、*ura4*⁺ 筛选标记。

酵母生长所需培养基及培养条件参考文献^[30]。

1.2 方法

1.2.1 同源敲除质粒及基因敲除菌株构建

同源敲除质粒 CHGL-Cnb1 的构建: 利用 Cnb1-

KO-Up-F 和 Cnb1-KO-Up-R 引物扩增 *cnb1*⁺ 上游同源区域 (Up 片段), 并引入 *Kpn* I / *Bgl* 酶切位点; 利用 Cnb1-KO-Dw-F 和 Cnb1-KO-Dw-R 引物扩增 *cnb1*⁺ 下游同源区域 (Dw 片段), 并引入 *Sac* I / *Bam* H 酶切位点。将 Up 片段和 Dw 片段酶切后, 分别克隆入 CHGL 质粒, 获得用于中断 *cnb1*⁺ 的质粒 CHGL-Cnb1。构建流程见图 1, 相关引物序列见表 2。荧光整合质粒 Cnb1-GFP 以相同方法构建。

基因敲除菌株的构建: *cnb1*⁺ 以同源重组的方式从 *S. pombe* 基因组中敲除^[28]。用 *Kpn* I / *Bam* H 双酶切 CHGL-Cnb1 质粒, 获得含有潮霉素筛选标记的敲除片段 (图 1)。转化 *S. pombe*, 经潮霉素筛选及鉴定^[28] 获得缺失突变体 *cnb1* Δ 。

1.2.2 稀释实验

在 YES 液体培养基中培养 *S. pombe* 至 *OD*₆₀₀ 大于 1.0。用无菌水将菌液稀释至 *OD*₆₀₀ 为 1.0, 再进行

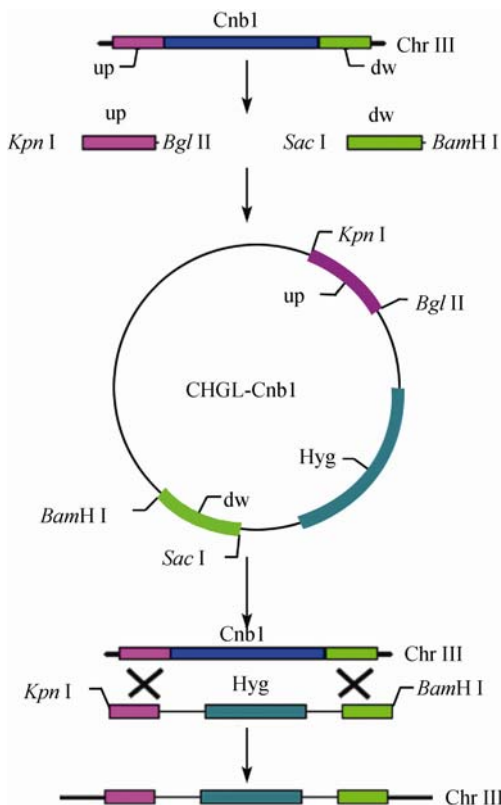
表 1 本研究所用裂殖酵母菌株

系统名称	简称	基因型	来源
F274	wt	<i>h</i> ⁺ <i>ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	实验室保存
JLP1590	wt	<i>h</i> ⁻ <i>ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	实验室保存
FJQ01	<i>cnb1</i> Δ	<i>h</i> ⁺ <i>cnb1::Hyg</i> ^R <i>ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	本研究构建
FJQ02	Cnb1-GFP	<i>h</i> ⁺ <i>cnb1::cnb1-GFP-Hyg</i> ^R <i>ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	本研究构建
FJQ03	Myo2-mCherry	<i>h</i> ⁺ <i>myo2::myo2-mCherry-ura4</i> ⁺ <i>ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	本研究构建
FJQ04	Cnb1-GFP Cdc4-mCherry	<i>h</i> ⁺ <i>cnb1::cnb1-GFP-Hyg</i> ^R <i>cdc4::cdc4-mCherry-ura4</i> ⁺ <i>ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	本研究构建
FJQ05	<i>cnb1</i> Δ Myo2-mCherry	<i>h</i> ⁺ <i>cnb1::Hyg</i> ^R <i>myo2::myo2-mCherry-ura4</i> ⁺ <i>ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	本研究构建
FJQ07	Atb2-GFP Sad1-mCherry	<i>h</i> ⁻ <i>atb2::GFP-atb2-Kan</i> ^R <i>sad1::sad1-mCherry-ura4</i> ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18</i>	本研究构建
FJQ08	<i>cnb1</i> Δ Atb2-GFP Sad1-mCherry	<i>h</i> ⁻ <i>cnb1::Hyg</i> ^R <i>atb2::GFP-atb2-Kan</i> ^R <i>sad1::sad1-mCherry-ura4</i> ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18</i>	本研究构建
FJQ09	<i>cnb1</i> Δ Spn1-GFP	<i>h</i> ⁻ <i>spn1-GFP::Kan</i> ^R <i>cnb1::Hyg</i> ^R <i>ura4-D18</i>	本研究构建
FJQ10	<i>cnb1</i> Δ Spn2-GFP	<i>h90 spn2::spn2-GFP-HA-Kan</i> ^R <i>cnb1::Hyg</i> ^R <i>ade6-216 leu1-32 lys1-131 ura4-D18</i>	本研究构建
FJQ11	<i>cnb1</i> Δ Spn3-GFP	<i>h90 spn3::spn3-GFP-HA-Kan</i> ^R <i>cnb1::Hyg</i> ^R <i>ade6-216 leu1-32 lys1-131 ura4-D18</i>	本研究构建
FJQ12	<i>cnb1</i> Δ Spn4-GFP	<i>h90 spn4::spn4-GFP-HA-Kan</i> ^R <i>cnb1::Hyg</i> ^R <i>ade6-216 leu1-32 lys1-131 ura4-D18</i>	本研究构建
FJQ13	Spn1-GFP	<i>h</i> ⁻ <i>spn1-GFP::Kan</i> ^R <i>ura4-D18</i>	文献 ^[7]
FJQ14	Spn2-GFP	<i>h90 spn2::spn2-GFP-HA-Kan</i> ^R <i>ade6-216 leu1-32 lys1-131 ura4-D18</i>	文献 ^[29]
FJQ15	Spn3-GFP	<i>h90 spn3::spn3-GFP-HA-Kan</i> ^R <i>ade6-216 leu1-32 lys1-131 ura4-D18</i>	文献 ^[29]
FJQ16	Spn4-GFP	<i>h90 spn4::spn4-GFP-HA-Kan</i> ^R <i>ade6-216 leu1-32 lys1-131 ura4-D18</i>	文献 ^[29]
FJQ17	Mid2-GFP	<i>h</i> ⁻ <i>mid2::GFP-mid2-Kan</i> ^R <i>ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	本研究构建
FJQ18	<i>cnb1</i> Δ Mid2-GFP	<i>h</i> ⁻ <i>cnb1::Hyg</i> ^R <i>mid2::GFP-mid2-Kan</i> ^R <i>ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	本研究构建
FJQ19	Cnb1-GFP Ppb1-mCherry	<i>h</i> ⁺ <i>cnb1::cnb1-GFP-Hyg</i> ^R <i>ppb1::ppb1-mCherry-leu1</i> ⁺ <i>ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	本研究构建
FJQ20	Ppb1-GFP	<i>h</i> ⁺ <i>ppb1::ppb1-GFP-Hyg</i> ^R <i>ade6-M210 leu1-32 ura4-D18</i>	本研究构建
FJQ21	<i>ppb1</i> Δ Spn1-GFP	<i>h</i> ⁻ <i>spn1-GFP::Kan</i> ^R <i>ppb1::Hyg</i> ^R <i>ura4-D18</i>	本研究构建
FJQ22	<i>ppb1</i> Δ Spn2-GFP	<i>h90 spn2::spn2-GFP-HA-Kan</i> ^R <i>ppb1::Hyg</i> ^R <i>ade6-216 leu1-32 lys1-131 ura4-D18</i>	本研究构建
FJQ23	<i>ppb1</i> Δ Spn3-GFP	<i>h90 spn3::spn3-GFP-HA-Kan</i> ^R <i>ppb1::Hyg</i> ^R <i>ade6-216 leu1-32 lys1-131 ura4-D18</i>	本研究构建
FJQ24	<i>ppb1</i> Δ Spn4-GFP	<i>h90 spn4::spn4-GFP-HA-Kan</i> ^R <i>ppb1::Hyg</i> ^R <i>ade6-216 leu1-32 lys1-131 ura4-D18</i>	本研究构建

表 2 构建 CHGL-*Cnb1* 质粒所用引物

引物名称	引物序列(5'→3')
Cnb1-KO-Up-F	CCC <u>GGTACC</u> ATTCTCAGATTTTGCTTCCTTCAT
Cnb1-KO-Up-R	CCC <u>AGATCT</u> GAGAGGGAAACACAATAATGAAAT
Cnb1-KO-Dw-F	CCC <u>GAGCTC</u> TGAGCATACTTAAAATTTAAACTG
Cnb1-KO-Dw-R	CCCTCTAG <u>AGGATCC</u> CAAATGAAAGTTCTTAATCTAATG

注: 下划线表示引入的酶切位点。

图 1 利用同源重组的方法在裂殖酵母中敲除 *cnb1*⁺ 基因

一系列 5 倍稀释。取 5 μ L 稀释液点于含有不同药物的 YES 平板上。药物浓度分别为 0.75 μ M BLM、10 μ M CPT、20 μ g/mL TBZ、7.5 μ M HU、0.01% MMS 和 2.5 μ M H_2O_2 。32 $^\circ$ C 培养 2~3 d, 观察菌落情况。环境胁迫的高温刺激条件为 37 $^\circ$ C。将点有 5 μ L 稀释液的 YES 平板置于 37 $^\circ$ C 培养 2~3 d, 观察菌落情况。

1.2.3 生长曲线及菌体形态观察

测定生长曲线: 将 F274(wt)、FJQ01(*cnb1* Δ)接种至 YES 液体培养基中, 32 $^\circ$ C 培养过夜。将过夜培养液转接至 50 mL YES 液体培养基中, 使起始 OD_{600} 为 0.2。于 32 $^\circ$ C 培养, 每 4 h 取样测量 OD_{600} 值, 同时在 X51 基础型倒置显微镜(奥林巴斯)下观

察菌体形态, 利用微分干涉(DIC)明场进行观察。

加药后菌体形态观察: 将酵母菌株接种至 YES 液体培养基中, 32 $^\circ$ C 培养过夜。将过夜培养液转接至 50 mL YES 液体培养基中, 使起始 OD_{600} 为 0.2。在培养基中加入 DNA 损伤试剂 BLM, 药物浓度为 0.5 μ M/mL。32 $^\circ$ C 培养 4 h 后收集菌体, 用 Calcofluor 对隔膜进行染色, 利用 X51 基础型倒置显微镜(奥林巴斯)观察形态。

菌体形态观察: 挑单克隆至 YES 液体培养基中, 32 $^\circ$ C 培养至对数生长期前期, 3 000 r/min 离心后, 取 2 μ L 菌液加入 Calcofluor 对隔膜进行染色, 利用 X51 基础型倒置显微镜(奥林巴斯)观察形态。

1.2.4 蛋白质免疫印迹检测(Western Blot)

裂殖酵母总蛋白的抽提方法及 Western blot 方法参见文献[31]。用 Anti-GFP 抗体(ABMart 公司)检测胞裂蛋白, 用 Anti-Actin 抗体(ABMart 公司)检测肌动蛋白作为内参。

1.2.5 激光共聚焦延时拍摄

挑单克隆至 YES 液体培养基中, 32 $^\circ$ C 培养过夜。将过夜培养液转接至新鲜的液体培养基中, 使起始 OD_{600} 为 0.3~0.6, 32 $^\circ$ C 培养 3~4 h。取 30~50 μ L 融化的 YES 固体培养基滴于载玻片中央, 用盖玻片轻压, 制成薄层培养基。取 2~3 μ L 菌液滴在薄层培养基中央, 加盖盖玻片, 制成观察玻片。将观察玻片倒置在激光共聚焦显微镜(蔡司, LSM700)上, 用 60 倍油镜进行荧光观察和拍摄。

2 结果与分析

2.1 *cnb1*⁺ 基因的缺失对细胞生长的影响

本研究对比分析了 *cnb1* Δ 菌株和野生型菌株的生长速度, 发现 *cnb1*⁺ 基因的缺失会使细胞生长缓慢(图 2A)。显微形态观察发现, *cnb1* Δ 细胞出现多隔膜、分枝等情况(图 2B)。在对数生长期的前期(0~8 h),

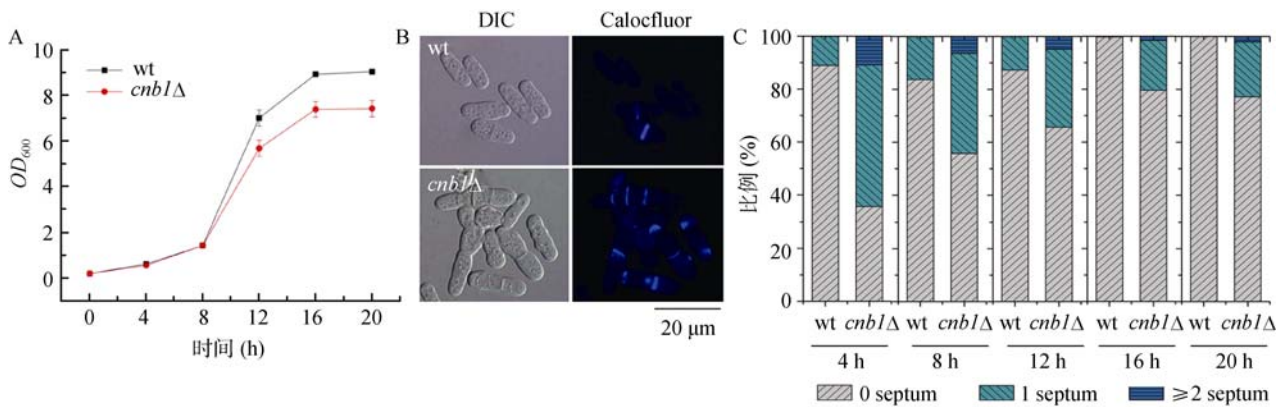


图 2 *cnb1*⁺基因的缺失对裂殖酵母生长及细胞表型的影响

A: 通过测量 OD_{600} 值记录 F274(wt)和 FJQ01(*cnb1*Δ)的生长曲线(数据为 3 组平行实验的平均值); B: 野生型和 *cnb1*Δ 的显微形态(DIC)及隔膜染色观察; C: 分别在培养 4 h、8 h、12 h、16 h、20 h 取适量菌液, 统计 F274(wt)和 FJQ01(*cnb1*Δ)中隔膜的数量。观察细胞数 >400 个。

*cnb1*Δ 菌株中含隔膜的细胞数占到总细胞数的 40% 左右, 而野生型菌株中含隔膜细胞数约为 18% 左右。在对数生长期末期(16~20 h), *cnb1*Δ 中含隔膜的细胞数约为 20% 左右, 而野生型中已经观察不到含隔膜的细胞(图 2C)。因此, 在整个培养过程中, *cnb1*Δ 菌株含有隔膜的细胞数量均多于野生型菌株。上述结果提示 *cnb1*⁺的缺失会引起隔膜降解的阻滞。

2.2 *cnb1*⁺基因的缺失对环境胁迫及 DNA 损伤试剂应答的影响

为了检测 *cnb1*⁺基因对环境胁迫和 DNA 损伤试

剂应答的影响, 本研究进行了系列稀释实验。结果显示, *cnb1*Δ 和野生型菌株一样, 对 DNA 损伤试剂不敏感(图 3A), 但对 2.5 mmol/L H_2O_2 及高温(37 °C)比较敏感。上述结果表明 Cnb1 可能参与了对于高氧和高温条件的应答。*cnb1*Δ 细胞在 0.5 mU/mL BLM 处理后, 细胞明显比野生型长(图 3B)。此外, 在 BLM 处理的情况下, 绝大多数野生型细胞不含有隔膜, 而超过 10% 的 *cnb1*Δ 细胞仍然含有隔膜(图 3B), 进一步提示了 Cnb1 与隔膜之间的关联。

2.3 Cnb1 定位于分裂平面上并与收缩环共定位

为了深入分析 Cnb1 在胞质分裂中的功能, 本

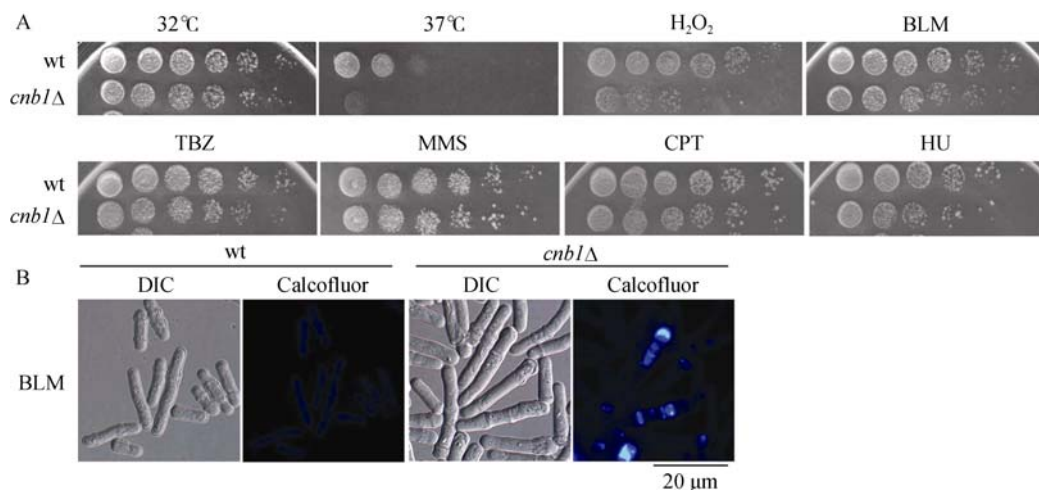


图 3 *cnb1*⁺的缺失对环境胁迫及 DNA 损伤条件下的裂殖酵母细胞生长和形态的影响

A: 将系列梯度稀释的菌液点在含有 7.5 mmol/L HU、0.75 mU/mL BLM、20 μg/mL TBZ、0.01% MMS、10 μmol/L CPT 及 2.5 mmol/L H_2O_2 的 YES 平板上, 32 °C 培养 2 d 后观察菌落生长情况。其中 37 °C 为高温环境胁迫条件, 32 °C 不加药平板为对照; B: 用 0.5 mU/mL BLM 处理对数生长期前期的 F274(wt)和 FJQ01(*cnb1*Δ)菌体 4 h, 观察菌体形态, 隔膜用 Calcofluor 染色。

研究首先对 *Cnb1* 的定位情况进行了观察。采用图 1 所示的同源重组方式, 将 GFP 荧光标签整合到 *cnb1*⁺ 基因的 C 端, 实现 *Cnb1*-GFP 的内源性表达, 菌株命名为 FJQ02(*Cnb1*-GFP)。激光共聚焦显微镜的观察结果显示, *Cnb1* 呈环状定位在分裂平面上。伴随着细胞的生长, *Cnb1* 会出现收缩行为(图 4A)。为了验证 *Cnb1* 是否与收缩环共定位, 构建了内源表达 *Cnb1*-GFP 和 *Cdc4*-mCherry 的菌株(FJQ04), 其中 *Cdc4* 是收缩环的组分。荧光定位数据表明, *Cnb1* 能与 *Cdc4* 共定位(图 4B), 说明 *Cnb1* 能与收缩环共定位。此外, 对 CN 催化亚基 *Ppb1* 进行了荧光定位分析, 结果表明 *Ppb1* 也能定位在分裂平面上(图 4C), 并且 *Ppb1* 能与 *Cnb1* 共定位(图 4D)。由此推测, *Cnb1*

与 *Ppb1* 可能以 CN 酶复合物的形式在分裂平面上与收缩环共定位。

为了检测 *Cnb1* 是否影响收缩环的组装, 本研究观察了 *cnb1* Δ 菌株中收缩环组分 *Myo2* 的定位。结果显示 *cnb1*⁺ 基因的缺失不影响 *Myo2* 的正常定位以及 *Myo2* 随收缩环收缩的行为(图 4E)。这表明收缩环的组装以及收缩行为不受 *Cnb1* 的影响。由于收缩环的收缩伴随着隔膜的成熟, 而 *Cnb1* 缺失后隔膜降解有迟滞, 因此该结果提示 *Cnb1* 也许与隔膜的成熟有关。

2.4 *Cnb1* 参与隔膜的成熟过程

已有报道表明, SIN 信号途径启动收缩环的收

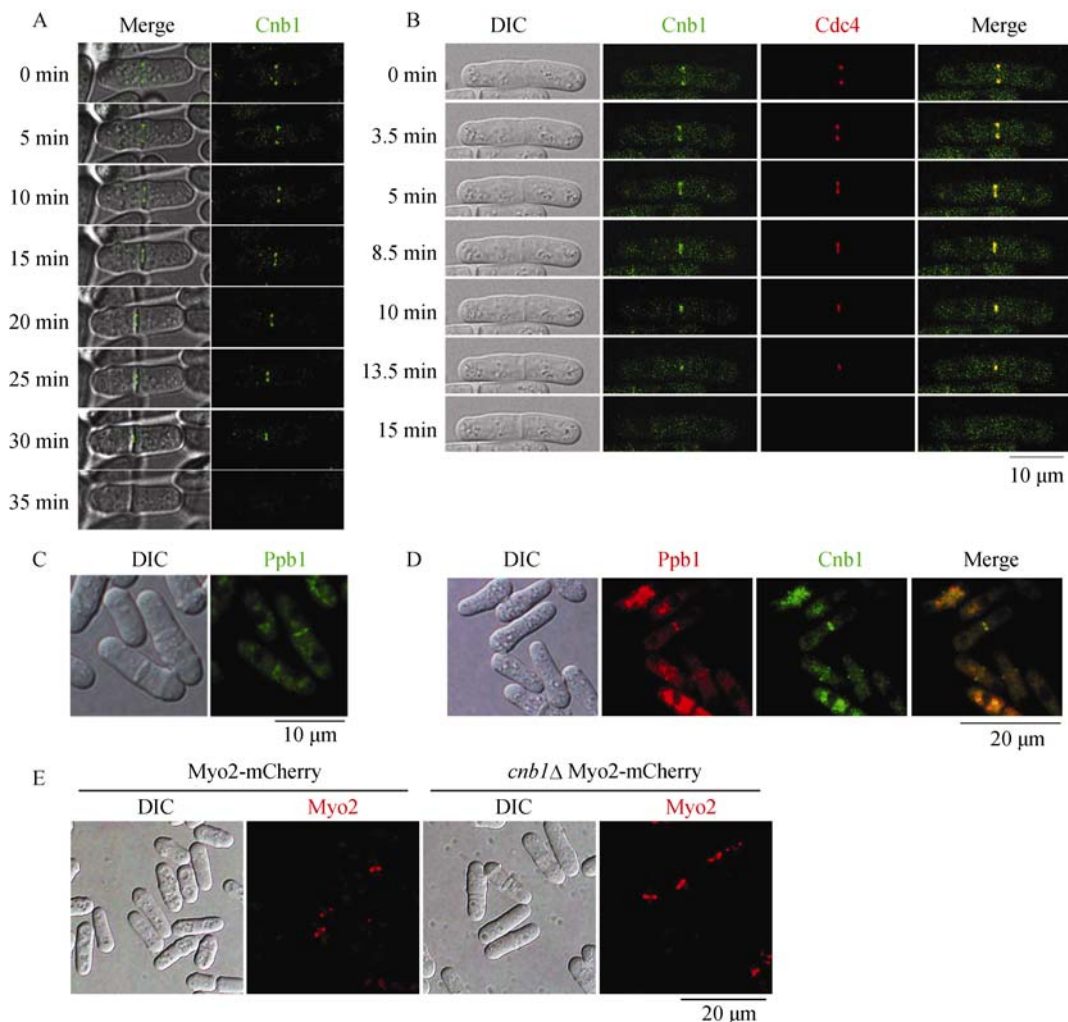


图 4 *Cnb1* 及 *Ppb1* 与收缩环组分在分裂平面上共定位

A: 取对数生长期前期的 FJQ02(*Cnb1*-GFP) 细胞, 用激光共聚焦显微镜拍摄 0~50 min 内 *Cnb1* 在细胞中的定位变化; B: 取对数生长期前期的 FJQ04(*Cnb1*-GFP *Cdc4*-mCherry) 细胞, 进行 *Cnb1* 与收缩环组分 *Cdc4* 共定位观察; C: 取对数生长期前期的 FJQ20(*Ppb1*-GFP) 细胞, 用荧光显微镜观察 *Ppb1* 定位; D: 取对数生长期前期的 FJQ19(*Cnb1*-GFP *Ppb1*-mCherry) 细胞, 进行 *Ppb1* 与 *Cnb1* 共定位观察; E: 取对数生长期前期的 FJQ03(*Myo2*-mCherry) 及 FJQ05(*cnb1* Δ *Myo2*-mCherry) 细胞, 观察 *cnb1*⁺ 基因缺失对收缩环组分 *Myo2* 定位的影响。

缩。收缩环在收缩过程中指导隔膜的形成和成熟^[32]。隔膜为“三明治”结构,中间是主要隔膜,两边为次要隔膜。主要隔膜的主要成分是 β -1,3-葡聚糖,次要隔膜的主要成分是 α -1,3-葡聚糖和分枝 β (1,3)- β (1,6)-葡聚糖^[33]。微管在胞质分裂过程中会发生解聚与重聚的重排过程。如果隔膜不成熟,中间留有空洞,微管会出现纵穿隔膜的现象^[24]。因此,通过观察胞质微管蛋白 Atb2 的分布,可以了解隔膜的成熟情况。通过荧光观察,发现 *cnb1*⁺ 缺失后, Atb2 发生纵穿隔膜的现象(图 5), 对应的野生型菌株则没有发生纵穿现象(图 5)。上述现象表明 Cnb1 缺失后,隔膜不成熟。结果提示, Cnb1 可能参与调节隔膜的成熟过程。

2.5 Cnb1 在胞裂蛋白的定位稳定性中发挥作用

胞裂蛋白环负责招募隔膜降解酶以降解隔膜^[34],因此胞裂蛋白环的异常会影响隔膜的降解,引起多隔膜的表型。*cnb1*⁺ 的缺失也能造成隔膜降解的阻滞,并引起多隔膜的表型,提示 Cnb1 可能与胞裂蛋白的功能相关。为了检测 Cnb1 是否会影响胞裂蛋白,本研究比较了野生型和 *cnb1* Δ 中 4 种胞裂蛋白的定位。结果显示,在野生型细胞中,所有的隔膜处都有胞裂蛋白的信号(图 6A、图 6B)。而在 *cnb1* Δ 中,80% 左右细胞的隔膜处没有 Spn2 或 Spn3 的信号,20% 左右细胞的隔膜处没有 Spn1 或 Spn4 的信号(图 6A、图 6B)。该结果提示 Cnb1 可能影响胞裂蛋白环的稳定性。此外,本研究也检测了 *ppb1* Δ 中 4 种胞裂蛋白的定位,结果表明 *ppb1*⁺ 的缺失与 *cnb1*⁺ 的缺失一样,也会影响胞裂蛋白环的稳定(图 6B)。

为了检测胞裂蛋白的缺失是否因蛋白的缺失造成,用 Western blot 的方法分析了 *cnb1* Δ 中胞裂蛋白的蛋白水平。结果表明,与野生型菌株相比, *cnb1* Δ 菌株中 4 种胞裂蛋白的蛋白水平没有下降(图 6C)。这表明在 *cnb1* Δ 细胞中,隔膜处胞裂蛋白信号的丢失,不是由转录翻译的缺陷导致。

胞裂蛋白环组装的异常可能造成隔膜处胞裂蛋白信号的丢失。为了检测 *cnb1*⁺ 的缺失是否影响胞裂蛋白环的组装,对 Mid2 蛋白的定位进行了观察。Mid2 蛋白是在胞裂蛋白环组装完成之后被征集到环上,起到稳定胞裂蛋白环的作用。当 Mid2 缺失时,胞裂蛋白环不稳定,会在分裂平面上形成弥散的碟状结构^[34,35]。荧光观察发现, *cnb1*⁺ 缺失后, Mid2 的定位依然正常(图 6A)。这表明胞裂蛋白环能正常组装并且招募 Mid2 蛋白。上述结果提示 *cnb1*⁺ 的缺失可能影响了胞裂蛋白环组装后的稳定性。

3 讨论

CN 的调节亚基广泛存在于真核生物中,裂殖酵母 Cnb1 与人 Ppp3r1 蛋白的氨基酸序列相似性为 75%,说明调节亚基在进化上具有很高的保守性,因此在裂殖酵母中进行的 Cnb1 功能研究,可以为哺乳动物中相应蛋白的功能研究起到一定的提示作用。

本研究发现, *cnb1*⁺ 缺失后菌株的生长速度缓慢,细胞出现多隔膜、胞质分裂阻滞的表型。通过荧光定位观察,发现 Cnb1 和 Ppb1 定位在分裂平面上,并与收缩环共定位。由此,我们推测 Cnb1 与 Ppb1 可能以 CN 酶复合物的形式与收缩环共定位。此外, *cnb1*⁺ 的缺失不影响收缩环的形成及收缩,表明

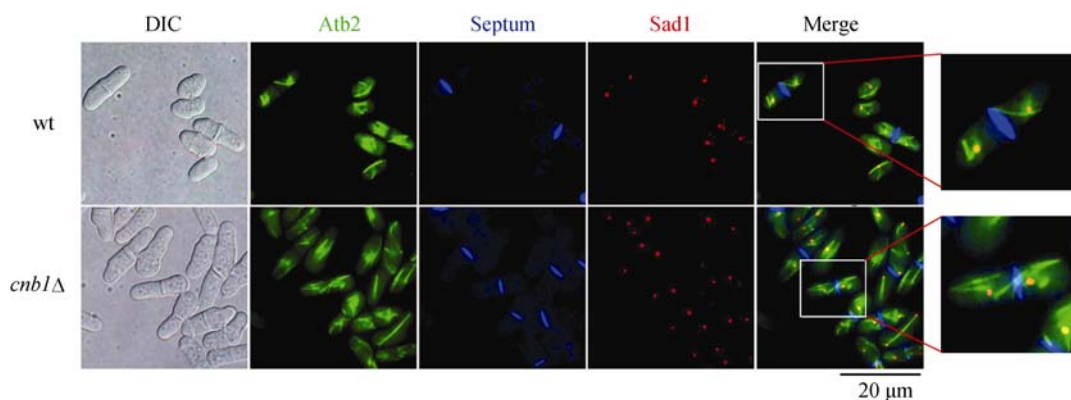


图 5 *cnb1*⁺ 的缺失影响隔膜的成熟

取对数生长期前期的 FJQ07(Atb-GFP Sad1-mCherry)及 FJQ08(*cnb1* Δ Atb-GFP Sad1-mCherry)细胞,观察微管蛋白 Atb2、纺锤体极体蛋白 Sad1 及隔膜的定位情况。Sad1 蛋白可以标定细胞核的位置。

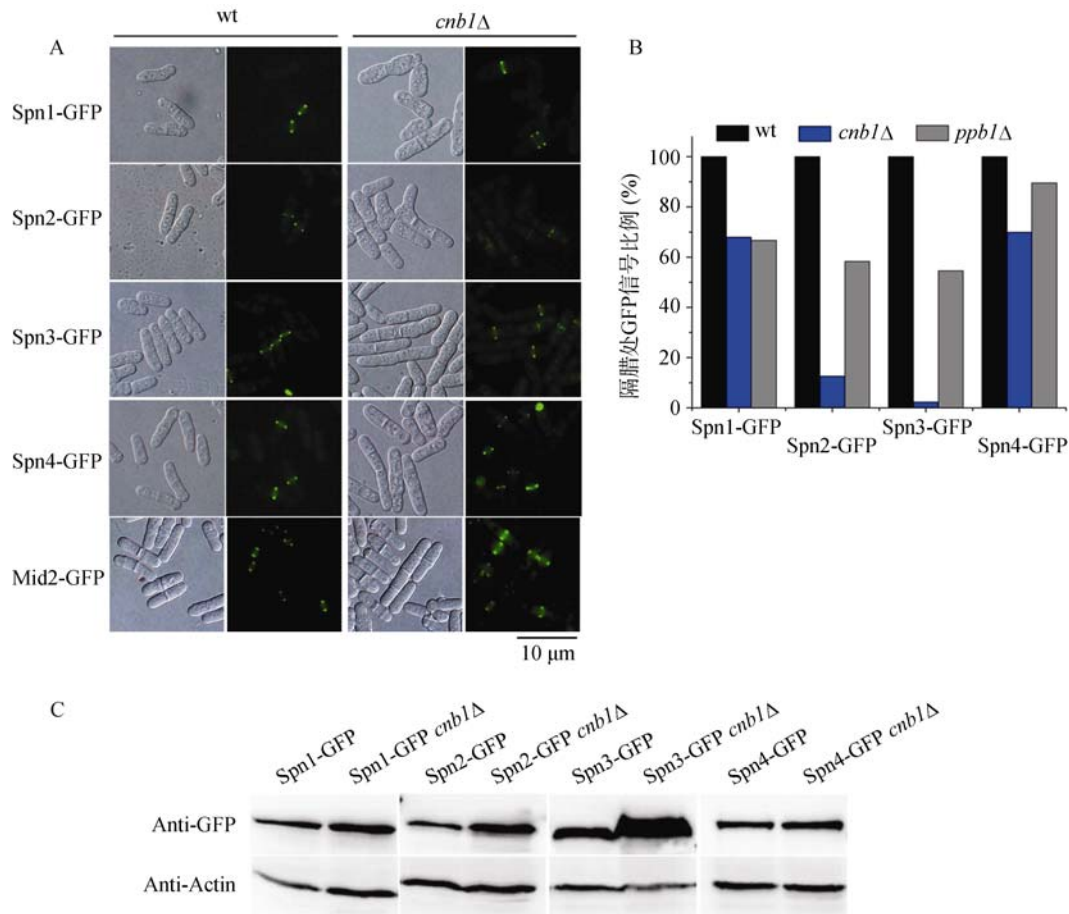


图 6 *cnb1*⁺的缺失对裂殖酵母胞裂蛋白的定位及其表达的影响

A : 分别对比观察 FJQ09(Spn1-GFP)、FJQ10(Spn2-GFP)、FJQ11(Spn3-GFP)、FJQ12(Spn4-GFP)、FJQ17(Mid2-GFP)菌株和 FJQ13(*cnb1*Δ Spn1-GFP)、FJQ14(*cnb1*Δ Spn2-GFP)、FJQ15(*cnb1*Δ Spn3-GFP)、FJQ16(*cnb1*Δ Spn4-GFP)、FJQ18(*cnb1*Δ Mid2-GFP)菌株中 Spn1、Spn2、Spn3、Spn4 和 Mid2 蛋白的定位; B : 对比分析野生型、*cnb1*⁺缺失和 *ppb1*⁺缺失菌株中, 明视野下的总隔膜数以及含有 Spn1、Spn2、Spn3 和 Spn4 荧光信号的隔膜数(观察细胞数>100 个); C : Western blot 检测 FJQ09(Spn1-GFP)、FJQ10(Spn2-GFP)、FJQ11(Spn3-GFP)、FJQ12(Spn4-GFP)、FJQ13(*cnb1*Δ Spn1-GFP)、FJQ14(*cnb1*Δ Spn2-GFP)、FJQ15(*cnb1*Δ Spn3-GFP)和 FJQ16(*cnb1*Δ Spn4-GFP)菌株中胞裂蛋白的蛋白水平, 利用 GFP 抗体检测胞裂蛋白, 以肌动蛋白(Actin)为内参。

Cnb1 不是收缩环的结构组分。缺失 *cnb1*⁺后, 微管出现纵穿隔膜的现象, 说明隔膜不完全成熟。此外, 已有报道表明 *ppb1*⁺缺失后也存在隔膜不成熟的现象^[24]。这些结果提示 *Cnb1* 可能参与调控了隔膜的成熟过程, 而且这种调控可能是通过 CN 的磷酸酶活性来实现的。

本研究还在 *cnb1*Δ菌株中检测了胞裂蛋白的定位情况。结果显示这 4 种蛋白的定位受到影响, 有 80%左右的细胞在隔膜处丢失了 Spn2 和 Spn3 信号。Mid2 蛋白在 *cnb1*Δ菌株中的正常定位表明胞裂蛋白环的初始组装没有异常。此外, 胞裂蛋白的表达量在 *cnb1*Δ菌株中没有发生下调。这些结果暗示 *Cnb1*

参与维持胞裂蛋白环的稳定性, 而且此过程并不依赖于转录调控。*ppb1*⁺缺失也能造成胞裂蛋白环稳定性的下降。但令人意外的是, *ppb1*⁺缺失对胞裂蛋白环的影响程度小于 *cnb1*⁺缺失(图 6B)。如果 *Cnb1* 与 *Ppb1* 通过发挥 CN 磷酸酶活性来参与维持胞裂蛋白环的稳定性, 那么 *ppb1*⁺缺失引起的表型应比 *cnb1*⁺缺失引起的表型严重。而事实与此相反, 这表明 *Cnb1* 与 *Ppb1* 在胞裂蛋白环稳定性维持中发挥的作用可能不依赖于 CN 的酶学活性, 其具体机制有待进一步研究。

因此, 我们认为 *Cnb1* 可能采用两种方式调节胞质分裂。一种是依赖 CN 酶学活性的方式, 影响了

隔膜的成熟。另一种是不依赖 CN 酶学活性的方式,影响胞裂蛋白环的稳定性。酶复合物以依赖酶活和不依赖酶活两种方式调节生物途径的方式并不罕见,如 PI3K 磷酸肌醇激酶,它由调节亚基 p85 和催化亚基 p110 组成,其调节亚基 p85 就存在不依赖于激酶活性的功能^[36]。CN 的多种生物途径调节方式将有助于丰富我们对胞质分裂调控的了解。

参考文献(References):

- [1] Goya A, Takaine M, Simanis V, Nakano K. Dividing the spoils of growth and the cell cycle: the fission yeast as a model for the study of cytokinesis. *Cytoskeleton*, 2011, 68(2): 69–88. [DOI](#)
- [2] Almonacid M, Paoletti A. Mechanisms controlling division-plane positioning. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21(9): 874–880. [DOI](#)
- [3] Guertin DA, Trautmann S, Mccollum D. Cytokinesis in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, 66(2): 155–178. [DOI](#)
- [4] Rajagopalan S, Wachtler V, Balasubramanian M. Cytokinesis in fission yeast: a story of rings, rafts and walls. *Trends Genet*, 2003, 19(7): 403–408. [DOI](#)
- [5] Feierbach B, Chang F. Cytokinesis and the contractile ring in fission yeast. *Curr Opin Microbiol*, 2001, 4(6): 713–719. [DOI](#)
- [6] Bathe M, Chang F. Cytokinesis and the contractile ring in fission yeast: towards a systems-level understanding. *Trends Microbiol*, 2010, 18(1): 38–45. [DOI](#)
- [7] Wu JQ, Ye YF, Wang N, Pollard TD, Pringle JR. Cooperation between the septins and the actomyosin ring and role of a cell-integrity pathway during cell division in fission yeast. *Genetics*, 2010, 186(3): 897–915. [DOI](#)
- [8] Kinoshita M. The septins. *Genome Biol*, 2003, 4(11): 236. [DOI](#)
- [9] An HM, Morrell JL, Jennings JL, Link AJ, Gould KL. Requirements of fission yeast septins for complex formation, localization, and function. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(12): 5551–5564. [DOI](#)
- [10] Martin-Cuadrado AB, Morrell JL, Konomi M, An HB, Petit C, Osumi M, Balasubramanian M, Gould KL, Del RF, de Aldana CR. Role of septins and the exocyst complex in the function of hydrolytic enzymes responsible for fission yeast cell separation. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(10): 4867–4881. [DOI](#)
- [11] Yoshida T, Toda T, Yanagida M. A calcineurin-like gene *ppb1⁺* in fission yeast: mutant defects in cytokinesis, cell polarity, mating and spindle pole body positioning. *J Cell Sci*, 1994, 107(Pt7): 1725–1735. [DOI](#)
- [12] Li HM, Rao A, Hogan PG. Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell Biol*, 2011, 21(2): 91–103. [DOI](#)
- [13] Klee CB, Draetta GF, Hubbard MJ. Calcineurin. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1988, 61: 149–200. [DOI](#)
- [14] Stathopoulos AM, Cyert MS. Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev*, 1997, 11(24): 3432–3444. [DOI](#)
- [15] Hirayama S, Sugiura R, Lu YB, Maeda T, Kawagishi K, Yokoyama M, Tohda H, Giga-Hama Y, Shuntoh H, Kuno T. Zinc finger protein Prz1 regulates Ca²⁺ but not Cl⁻ homeostasis in fission yeast. Identification of distinct branches of calcineurin signaling pathway in fission yeast. *J Biol Chem*, 2003, 278(20): 18078–18084. [DOI](#)
- [16] Aramburu J, Heitman J, Crabtree GR. Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. *EMBO Rep*, 2004, 5(4): 343–348. [DOI](#)
- [17] Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev*, 2003, 17(18): 2205–2232. [DOI](#)
- [18] Ruiz A, Yenush L, Arino J. Regulation of ENA1 Na⁺-ATPase gene expression by the Ppz1 protein phosphatase is mediated by the calcineurin pathway. *Eukaryot Cell*, 2003, 2(5): 937–948. [DOI](#)
- [19] Stathopoulos-Gerontides A, Guo JJ, Cyert MS. Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Genes Dev*, 1999, 13(7): 798–803. [DOI](#)
- [20] Viladevall L, Serrano R, Ruiz A, Domenech G, Giraldo J, Barceló A, Ariño J. Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2004, 279(42): 43614–43624. [DOI](#)
- [21] Yoshimoto H, Saltsman K, Gasch AP, Li HX, Ogawa N, Botstein D, Brown PO, Cyert MS. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2002, 277(34): 31079–31088. [DOI](#)
- [22] Perrino BA, Ng LY, Soderling TR. Calcium regulation of calcineurin phosphatase activity by its B subunit and calmodulin. Role of the autoinhibitory domain. *J Biol Chem*, 1995, 270(1): 340–346. [DOI](#)
- [23] Sio SO, Suehiro T, Sugiura R, Takeuchi M, Mukai H, Kuno T. The role of the regulatory subunit of fission yeast calcineurin for *in vivo* activity and its relevance to FK506 sensitivity. *J Biol Chem*, 2005, 280(13): 12231–12238. [DOI](#)
- [24] Lu YB, Sugiura R, Yada T, Cheng H, Sio SO, Shuntoh H, Kuno T. Calcineurin is implicated in the regulation of the

- septation initiation network in fission yeast. *Genes Cells*, 2002, 7(10): 1009–1019. [DOI](#)
- [25] Zhang YJ, Sugiura R, Lu YB, Asami M, Maeda T, Itoh T, Takenawa T, Shuntoh H, Kuno T. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase Its3 and calcineurin Ppb1 coordinately regulate cytokinesis in fission yeast. *J Biol Chem*, 2000, 275(45): 35600–35606. [DOI](#)
- [26] Matsuyama A, Arai R, Yashiroda Y, Shirai A, Kamata A, Sekido S, Kobayashi Y, Hashimoto A, Hamamoto M, Hiraoka Y, Horinouchi S, Yoshida M. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(7): 841–847. [DOI](#)
- [27] Fox DS, Cruz MC, Sia RA, Ke HM, Cox GM, Cardenas ME, Heitman J. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, 2001, 39(4): 835–849. [DOI](#)
- [28] Gegan J, Rabitsch PK, Rumpf C, Novatchkova M, Schleiffer A, Nasmyth K. High-throughput knockout screen in fission yeast. *Nat Protoc*, 2006, 1(5): 2457–2464. [DOI](#)
- [29] Hayashi A, Ding DQ, Tsutsumi C, Chikashige Y, Masuda H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Localization of gene products using a chromosomally tagged GFP-fusion library in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells*, 2009, 14(2): 217–225. [DOI](#)
- [30] Forsburg SL, Rhind N. Basic methods for fission yeast. *Yeast*, 2006, 23(3): 173–183. [DOI](#)
- [31] Chen JQ, Li Y, Pan X, Lei BK, Chang C, Liu ZX, Lu H. The fission yeast inhibitor of growth (ING) protein Png1p functions in response to DNA damage. *J Biol Chem*, 2010, 285(21): 15786–15793. [DOI](#)
- [32] Wolfe BA, Gould KL. Split decisions: coordinating cytokinesis in yeast. *Trends Cell Biol*, 2005, 15(1): 10–18. [DOI](#)
- [33] Jin QW, Zhou MA, Bimbo A, Balasubramanian MK, Mccollum D. A role for the septation initiation network in septum assembly revealed by genetic analysis of *sid2-250* suppressors. *Genetics*, 2006, 172(4): 2101–2112. [DOI](#)
- [34] Berlin A, Paoletti A, Chang F. Mid2p stabilizes septin rings during cytokinesis in fission yeast. *J Cell Biol*, 2003, 160(7): 1083–1092. [DOI](#)
- [35] Tasto JJ, Morrell JL, Gould KL. An anillin homologue, Mid2p, acts during fission yeast cytokinesis to organize the septin ring and promote cell separation. *J Cell Biol*, 2003, 160(7): 1093–1103. [DOI](#)
- [36] García Z, Silio V, Marqués M, Cortés I, Kumar A, Hernandez C, Checa AI, Serrano A, Carrera AC. A PI3K activity-independent function of p85 regulatory subunit in control of mammalian cytokinesis. *EMBO J*, 2006, 25(20): 4740–4751. [DOI](#)