

# 酵母菌磷脂酰肌醇(PI)的生物合成及其重要的生理学功能

池振明 张厚程 赵双枝

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

**摘要** 本文对近年来在酵母菌磷脂酰肌醇(PI)生物合成, PI与酵母菌信号传导的相互关系, PI在酵母菌耐浓度酒精中的作用和PI在酵母菌胞外酶分泌解阻遏中的作用等方面最新研究进展进行了较为全面的讨论。

**关键词** 磷脂酰肌醇(PI) 信号传导 耐酒精 蔗糖酶分泌

随着对酵母菌基因组序列分析的完成和对酵母菌生理和代谢调控的不断了解, 人们发现酵母菌是研究真核生物细胞极好的模式生物。酵母菌细胞膜磷脂除了把细胞分为不同区域外, 还控制着细胞遇到外来物刺激时细胞内所发生的各种反应。酵母菌的磷脂主要由磷脂酸(PA)、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰丝氨酸(PS)和心磷脂(CL)组成的<sup>[1]</sup>。其中PI(phosphatidylinositol)近年来引起了人们的高度重视, 因为它在细胞中对于细胞形态、代谢调控、信号传导和细胞的各种生理功能起着非常重要的作用<sup>[2]</sup>。由于酵母细胞的许多基因与高等真核生物细胞相应的基因具有同源性, 在代谢调节和生理功能方面具有许多类似之处, 所以研究PI在酵母细胞中的功能有助于了解PI在高等真核细胞中的作用, 特别是有助于了解PI在提高人类细胞的代谢活力和寿命中的作用。

## 1 在酵母菌中PI的生物合成

PI的化学结构如图1所示, 从该图可以看出PI主要由两部分组成的, 一是磷酸1,2-二脂酰甘油, 二是肌醇(inositol)。在酵母菌细胞中CDP-二酰基甘油(CDP-DAG)在PI合成酶催化下可以与肌醇起反应生成PI, 该酶是与膜结合的, 它催化肌醇和CDP-DAG直接合成PI, 该酶现已得到纯化, 发现它只有一个亚基, 分子量为34kD, 只有在 $Mn^{2+}$ 和 $Mg^{2+}$ 存在情况下该酶才有活力。编码PI合成酶的基因称为PIS1基因, 已在酵母菌细胞中克隆到了PIS1基因, 当把该基因引入PI合成缺陷型中, 细胞生长和PI合成酶活力便得到恢复。与野生型细胞相比, 通过这种基因工程技术得到的转化子其PI合成酶活力提高了8倍, 但是细胞膜中的PI含量并没有增加<sup>[12]</sup>。相反, 在培养基中人工加入肌醇却可以导致

细胞中的PI含量明显增加, 如Kelly等人<sup>[11]</sup>报道当培养基含有肌醇时, 酵母菌细胞膜的PI含量可以从10%增加到27%, 在这种情况下, 用于合成PI的CDP-DAG是来自于PS, 因为PI合成酶和PS合成酶要竞争它们的共同底物, 即: CDP-DAG, 并且肌醇是PS合成酶的非竞争性抑制剂。这说明培养基中人工加入的肌醇是细胞PI生物合成的关键调节因素, 而且在培养基中添加肌醇还会调节细胞的许多其他生化反应。酵母细胞中PI和肌醇的合成过程如图2所示, 当培养基含有肌醇时, 酵母菌细胞中的肌醇-1-磷酸合成酶便受到阻遏, 从而阻止了肌醇的合成, 这时细胞便利用培养基中的肌醇来合成PI。当培养基中不含肌醇时, 酵母菌细胞自己可以合成肌醇, 但是在这种情况下, 与培养基中添加肌醇培养的细胞相比, 细胞中的PI含量较低。

那么肌醇的存在如何影响和调节有关基因的功能, 一是影响有关基因的转录, 对于这些基因来说, 转录受肌醇的影响是通过顺式作用 $UAS_{NO}$ 序列和反式作用 $INO2$ - $INO4$ - $OPII$ 调节基因。二是通过转录后修饰调节, 至少两种与磷脂生物合成的酶, 如: PGP合成酶和PS合成酶是通过这种方式调节的。把肌醇加入培养基后数分钟内PGP合成酶比活力迅速

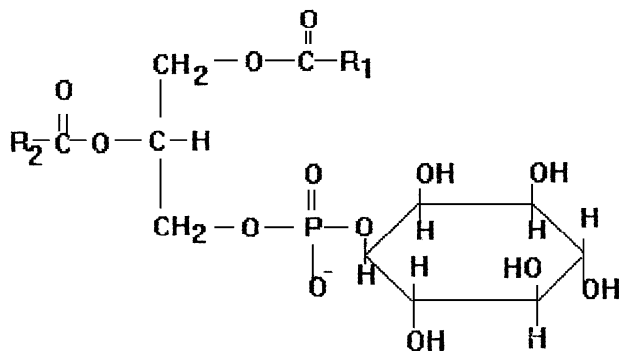


图1 PI化学结构示意图

下降,这种情况仅用酶合成阻遏很难给以解释,所以有可能酶受到失活和或降解的结果。PS 合成酶 23-kDa 亚基在细胞内和细胞外都会受到依赖 cAMP 蛋白激酶的磷酸化作用,在依赖 cAMP 蛋白激酶活力很高的突变株 *bcy1* 中 PS 合成酶活力便下降,而在另一株低激酶活力突变菌株 *cyr1* 中 PS 合成酶就很高,把 cAMP 加入到 *cyr1* 中马上导致 PS 合成酶活力下降,PI 和 PS 比例升高。细胞处在对数期的 PS 合成酶就会受到磷酸化作用,PS 合成酶活力下降。而到了稳定期,由于依赖 cAMP 蛋白激酶失去活性,PS 合成酶活力就上升。PS 合成酶还会受到肌醇的变构调节。细胞中许多酶还会受到磷脂环境的修饰。比如,PI 合成酶活力就会受到 PS 的刺激,而 PS 合成酶活力会随着 PI/PS 的比例增加而降低。所以说尽管 PI 合成酶不在转录水平进行调节,也不受生长周期的影响,但是酶本身是受到变构调节。由于 PI 合成酶和 PS 合成酶要竞争 CDP-CAG,所以这两种酶的变构调节对整个磷脂合成来说是非常关键的。

上述的这些调节机制如何对外加的肌醇作出反应呢?对于 PS 合成酶来说,转录受到阻遏,酶活力通过变构作用被肌醇抑制,随着 PS 合成酶活力下降,PI 合成酶活力增加,PI/PS 比例增加,这进一步

导致 PS 合成酶活力受到抑制。当肌醇消耗完之后,转录又受到解阻遏,酶不再受到抑制,有更多的 PS 被合成。

## 2 PI 与细胞的信号传导

在酵母菌细胞中,PI 在激酶催化下通过依赖 ATP 的磷酸化作用 (ATP-dependent phosphorylation) 可分别在肌醇分子的第 4 位和第 5 位上发生磷酸化反应,形成 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇 ( $PIP_2$ )。当细胞外的某些刺激物与细胞质膜表面的受体结合后,可以活化对磷脂酰肌醇特异的磷脂酶 C (phosphatidylinositol specific phospholipase C, 简称 PLC),在细胞质膜上的 PLC 把  $PIP_2$  裂解成具有第二信使功能的 1,4,5-三磷酸肌醇 ( $IP_3$ ) 和二酰基甘油 (DAG)。由于  $IP_3$  是可溶性的,它便从细胞质膜上进入细胞质中,这时便引起细胞内的钙离子库,如内质网的钙离子库得到释放,细胞质中钙离子浓度的增加可以活化细胞中许多酶,如蛋白质激酶 C (protein kinase C 简称 PKC) 的转位和激活,但是 PKC 的完全激活还需要 DAG 和 PS。PKC 激活后会引引起 pH 和细胞膜的一系列变化<sup>[3]</sup>。Brandao 等人<sup>[4]</sup>发现把葡萄糖加到酵母菌培养物中会引起质膜  $H^+$ -ATP 酶迅速活化,

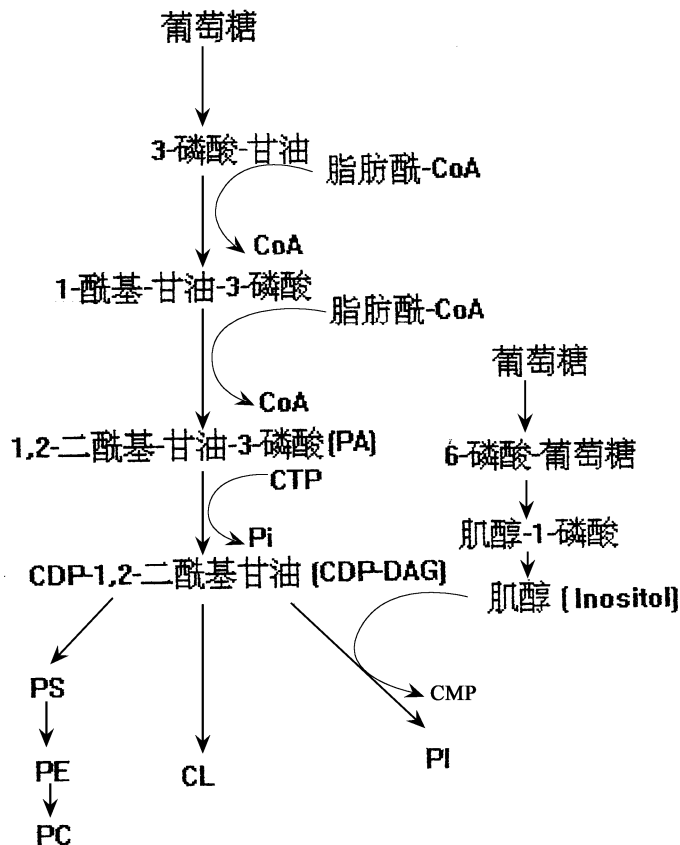


图 2 在酵母菌细胞中 PI 和其他磷脂的生物合成途径

并刺激细胞排出  $H^+$ ，把 DAG 和蛋白质激酶 C 的其他活化剂加到培养基中也会活化质膜  $H^+$ -ATP 酶，并同时引起细胞排出  $H^+$ 。新霉素可以特异地与  $PIP_2$  形成复合物，另外一种化合物 48/80 是 PLC 的特异抑制剂，把这两种物质加入到细胞培养物中可以完全抑制质膜  $H^+$ -ATP 酶的活化和细胞排出  $H^+$ ，这些结果说明在酵母菌细胞中磷脂酰肌醇类的信号传导途径(PI type signalling pathway)参与了由葡萄糖引起的质膜  $H^+$ -ATP 酶的活化作用和细胞质子的排出。

### 3 PI 与酵母菌耐高浓度酒精

磷脂是细胞膜的最重要成分，所以人们自然会想到它们在酵母耐酒精能力方面可能起着重要的作用。例如，人工加入的 PC (phosphatidylcholine) 可以提高清酒酵母菌细胞生长速率、酒精发酵活力和乙醇耐受力<sup>[5]</sup>。然而，Mishra 等人<sup>[7]</sup>发现富含 PS 的酒精酵母菌细胞对乙醇具有抗性，而富含 PE (phosphatidylethanolamine) 和 PC 的酵母细胞对乙醇的抗性较差。上面谈到在培养基中添加肌醇对 PI 的合成有很明显的影响。在测定高浓度酒精发酵过程中产高浓度酒精酵母菌细胞脂类变化情况后，我们发现添加肌醇对主要磷脂的合成有明显的影响，当发酵培养基中存在有肌醇时，细胞的 PI 含量不断地在增加，而 PC 和 PE 含量在下降。然而，发酵培养基中不存在肌醇时，在 24 小时内 PI 含量在迅速下降，随后又上升，但是 PI 含量总是比含有肌醇时的少。当酵母细胞含有较高浓度的 PI 时，可以产生较高浓度的酒精，并且产酒精的速率也较快。由于发酵到 24 小时，在含有肌醇培养基中生长的细胞 PI 含量比在不含肌醇培养基中生长的细胞 PI 含量有明显增加，同时从遗传角度来说，它们的遗传背景却是相同的，所以利用这些细胞在 18% (v/v) 乙醇溶液中进行处理，结果发现 PI 含量高的细胞死亡的速率明显较慢，这些结果说明 PI 在酵母菌产高浓度酒精和耐高浓度酒精中起着重要的作用。但是，从分子生物学和生物化学角度来看，PI 如何发挥高产酒精和耐高浓度酒精的作用现在还不清楚。我们认为高浓度的 PI 可能对质膜蛋白质，特别是质膜 ATP 酶和质膜完整性起保护作用，以免受高浓度酒精的有害影响，但这种假设需要实验来证实<sup>[6]</sup>。同时有人发现细胞质膜上的某种磷脂不是均匀分布的，而是围绕并集中在某些蛋白质周围，很可能 PI 也具有这种特性，是围绕着质膜 ATP 酶分

布的，并对质膜 ATP 酶起保护作用。

### 4 PI 类的信号传导与酵母菌胞外酶型分泌

由于酵母菌是最安全的微生物，并且酵母菌是表达外源基因和内源基因产生胞外蛋白质的良好宿主，所以最近几年对酵母菌的蛋白质分泌进行了广泛的研究，并得到了许多重要的进展。但是蛋白质分泌与细胞膜组分之间有什么相互关系至今还不清楚，要分泌的蛋白质在核糖体上合成，并转换到内质网中开始，一直到分泌小泡与细胞质膜融合，始终与膜组分有密切的关系，现有大量的报道真核细胞中许多酶的修饰和调节需要一定种类的磷脂环境，David 等人<sup>[8]</sup>也发现细胞膜上的脂肪酸长度与蛋白质分泌有一定的关系。为此我们研究了细胞膜脂类的变化与酵母蔗糖酶分泌的相互关系，发现产高浓度酒精酵母菌生长在不含有肌醇的合成培养基中时，培养基中葡萄糖浓度大于 0.2% (w/v) 或蔗糖浓度大于 0.5% (w/v) 就会对蔗糖酶分泌起阻遏作用，当合成培养基中含有人工加入的肌醇 (100 $\mu$ g/ml) 时，培养基中葡萄糖浓度达到 2.0% (w/v) 或蔗糖浓度达到 4.0% (w/v) 时蔗糖酶分泌量达到最大，这些结果说明在培养基中添加肌醇可以使酵母菌蔗糖酶分泌起解阻遏作用，但是当葡萄糖浓度大于 2.0% (w/v) 或蔗糖浓度大于 4.0% (w/v) 时，蔗糖酶分泌又受到阻遏<sup>[2]</sup>。这种添加肌醇可以使酵母菌蔗糖酶分泌起解阻遏作用其生物化学和分子生物学机理是什么呢？

现有实验证据表明在酒精酵母菌细胞中有两种形式的蔗糖酶，即分泌并受到糖基化的胞外蔗糖酶和非分泌并无糖基化的胞内蔗糖酶。前者的合成和分泌受到葡萄糖的阻遏，当细胞处在解阻遏状态下，大部分酵母菌蔗糖酶为胞外酶。而后者是组成型的，不受培养基中葡萄糖浓度变化的影响。有人从分子转录水平上对这两类蔗糖酶的合成和调节提出了一个模型，编码胞外蔗糖酶的大的小的受到调节的 mRNA 含有合成信号肽序列的起始密码子，由于由该 mRNA 编码的蔗糖酶蛋白质分子含有信号肽，所以可以被转移到内质网中，这样便可以分泌到细胞外。而编码胞内蔗糖酶的小的不受到调节的 mRNA 因不含有合成信号肽序列的起始密码子，所以合成的蔗糖酶只能位于细胞内，无法被分泌到细胞外，现已分离到编码蔗糖酶的 SUC2 基因，该基因的确可以编码两种 mRNA (1.8kb 和 1.9kb)，它们的 5' 端是不一样的，1.9kb 的 mRNA 水平受到了葡萄

糖浓度的调节,而 1.8kb 的 mRNA 合成不受到调节<sup>[9]</sup>。根据这个模型,我们对添加肌醇引起的蔗糖酶分泌解阻遏作用进行了解释,认为这种解阻遏作用是发生在相应 mRNA 转录水平上。就像我们上面所讨论的那样,在培养基中添加肌醇,引起酵母菌细胞中的 PI 含量增加,PI 通过依赖 ATP 的磷酸化作用被转化 PI 4 磷酸 (PIP) 和 PI 4, 5-二磷酸 (PIP<sub>2</sub>), PIP<sub>2</sub> 在 PLC 催化下被水解成具有第二信使功能的 IP<sub>3</sub> 和 DAG, 结果导致细胞中许多酶的活化。在该研究情况下, PI 含量的增加最终导致催化合成大 mRNA 的酶受到活化,而使阻遏蛋白活力受到抑制或不起作用,因此由添加肌醇引起的解阻遏细胞能合成大量的大 mRNA, 分泌的蔗糖酶随之增加,从而出现上述的现象<sup>[2]</sup>。我们现在正在用 SUC2 基因作为探针通过杂交的方法分别分离阻遏和解阻遏细胞中的编码蔗糖酶的 mRNA, 以便对该假设进行证实。同时为了证实 PI 类的信号传导与酵母菌蔗糖酶分泌的相互关系,我们可以利用对 PIP<sub>2</sub> 具有特异结合的新霉素和对 PLC 具有抑制作用的化合物 48/80 进行研究, PIP<sub>2</sub> 与新霉素结合后或 PLC 被化合物 48/80 抑制后, PI 类的信号传导就无法进行,这时添加肌醇就不会对蔗糖酶分泌起解阻遏作用。

对真菌胞外酶基因启动子的研究表明, 在这些启动子中存在有与碳分解代谢物阻遏蛋白结合和与活化蛋白结合的两个位点, 这两个位点可以发生交叠, 所以阻遏蛋白和活化蛋白要竞争与启动子的结合, 所以当葡萄糖浓度或蔗糖浓度继续增加时, 由

葡萄糖代谢物引起的阻遏作用大于由 PI 类信号传导途径引起的解阻遏作用, 所以又导致胞外蔗糖酶分泌量下降<sup>[10]</sup>。

PI 除了具有上述功能外, 还有许多其他的生理学功能, 如酵母菌细胞由于基因突变失去合成肌醇能力时, 核酸、碳水化合物和脂类本身的代谢就受到严重的影响, 最终导致细胞死亡, 发酵、呼吸和糖运输能力停止, 细胞分裂终断, 细胞的 K<sup>+</sup> 和 ATP 浓度下降, 或细胞形态出现异常等, 这里就不再详细讨论了。

## 参考文献

- [ 1 ] Greenberg ML, et al. Microbiological Reviews, 1996; 60( 1): 1- 20
- [ 2 ] Chi Z, et al. Enzyme and Microbial Technology, 1997; 21( 6): 463 - 467
- [ 3 ] Divecha N, et al. Cell, 1995; 80 ( 2): 269- 278
- [ 4 ] Bandao RL, et al. Biochimica et Biophysica Acta, 1994; 1223: 117 - 124
- [ 5 ] 池振明, 高峻等, 微生物学通报, 1999; 26( 5): 373- 376
- [ 6 ] Chi Z, et al. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1999; 22( 1): 58- 63
- [ 7 ] Mishra P, et al. Appl Microbiol Biotechnol, 1991; 34: 697- 702
- [ 8 ] David et al., Journal of Cell Biology, 1998; 143 ( 3): 1167- 1182
- [ 9 ] Marian C, et al. Cell, 1982; 28: 145- 154
- [ 10 ] MacKenzie DA, et al. Journal of General Microbiology, 1993; 139: 2295- 2307
- [ 11 ] Kelley MJ, et al. The Journal of Biological Chemistry, 1988; 263: 18078- 18085
- [ 12 ] 池振明, 山东大学博士论文, 1997; 70- 80

## Biosynthesis of Phosphatidylinositol and its Physiological Functions in Yeasts

Chi Zhen ming Zhang Hou cheng Zhao Suang zhi

(The State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)

**Abstract** In this article, biosynthesis of phosphatidylinositol (PI) in yeasts, relationship between PI and signal transduction and roles of PI in high ethanol tolerance and derepression of invertase secretion in yeasts are reviewed.

**Key words** phosphatidylinositol (PI), signal transduction, ethanol tolerance, invertase secretion