

环境变化和时序衰老过程中酵母蛋白激酶 Sch9 磷酸化的调控*

刘 军 闫 磊 郝蓓蓓 刘 科**

(四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要 出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)蛋白激酶 Sch9 与哺乳动物蛋白激酶 S6K1 同源. S6K1 是哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)的底物, 且与很多人类疾病相关, 包括肥胖症、糖尿病和癌症. Sch9 和 S6K1 都对不同营养条件和环境胁迫条件下的细胞生长调控很重要. Sch9 激活环内的磷酸化位点 570 位苏氨酸残基也被称为 PDK1 位点, 而 737 位苏氨酸位点也被称为 PDK2 位点, 这两个位点的磷酸化对 Sch9 的活性非常重要. 蛋白激酶 Pkh1/2 磷酸化 Sch9 的 PDK1 位点, 而雷帕霉素靶蛋白复合体 1(TORC1)磷酸化 PDK2 位点. 为了深入了解 Sch9 在细胞中的功能, 阐明不同环境条件下及时序衰老过程中 Sch9 的 PDK1 和 PDK2 位点磷酸化的调控就显得尤为重要. 利用特异性识别 570 位苏氨酸残基磷酸化的 Sch9 蛋白和特异性识别 737 位苏氨酸残基磷酸化的 Sch9 蛋白的两种抗体, 对不同环境条件下和时序衰老过程中 Sch9 的两个位点的磷酸化调控进行了研究. 研究结果揭示了 Sch9 的两个磷酸化位点在营养感受、胁迫应答、热量限制和时序衰老过程中的调控方式. 揭示 Sch9 的 PDK1 位点磷酸化的调控与热量限制延长出芽酵母时序寿命密切相关.

关键词 Sch9, 磷酸化, PDK1, PDK2, S6K1, 胁迫应答, 热量限制, 时序衰老

学科分类号 Q81, Q78, Q936

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00025

单细胞真核生物出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是研究细胞对营养感受和胁迫应答机制非常理想的材料^[1-2], 也是研究衰老机制非常好的模式生物^[3]. 出芽酵母中的雷帕霉素靶蛋白复合体 1(TORC1)和雷帕霉素靶蛋白复合体 2(TORC2)主要负责控制细胞生长^[4]. 雷帕霉素(rapamycin)会特异性地抑制 TORC1 活性, 而不会抑制 TORC2^[5]. 报道显示位于 Sch9 C 端的 6 个丝氨酸 / 苏氨酸残基(T723、S726、T737、S758、S765 和 S711)直接被 TORC1 磷酸化^[6]. TORC1 控制的 Sch9 的 6 个位点的磷酸化对 Sch9 的功能至关重要^[6]. Sch9 的 C 端磷酸化会因环境中的营养状况和胁迫条件的变化发生改变^[6]. Sch9 与哺乳动物中的 S6K1 激酶同源而非 PKB^[6]. 而 Sch9 激活环内的磷酸化位点 570 位苏氨酸则是蛋白激酶 Pkh1/2 的靶标^[6-8]. 哺乳动物 3-磷酸肌醇依赖的蛋白激酶 1(PDK1)激活其下游底物靶蛋白, 需要磷酸化底物中的一个保守基序 Thr*-Phe-Cys-Gly-Thr-X-Glu-Tyr(星号代表磷酸化

位点, X 代表任意氨基酸残基)中的苏氨酸残基^[9], 这个磷酸化位点也被称为 PDK1 位点. 完全激活 Akt/PKB 与血清 / 糖皮质激素可诱导激酶(SGK)或其他 PDK1 底物, 除了需要磷酸化 PDK1 位点, 还需要同时磷酸化另外一个位于 C 端的保守疏水基序(Phe-X-X-Aro-Ser/Thr*-Aro)中的苏氨酸残基(星号代表磷酸化位点, Aro 代表苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸)^[10-11]. 磷脂酰肌醇 3 激酶的抑制剂可以抑制 PKB 中这个疏水基序保守位点的磷酸化^[10]. 但是, 无论是重组的或者是纯化的 PDK1 蛋白都无法磷酸化 PKB 中这个疏水基序保守位点^[12-13], 因此, 为了区别于 PDK1, 这个位点也被称为 PDK2 位点. 蛋白激酶 Pkh1/2 与哺乳动物 PDK1 同源, 而 Pkh1/2

* 国家自然科学基金资助项目(30671181/C0603).

** 通讯联系人.

Tel: 028-85415008, E-mail: kliu@scu.edu.cn

收稿日期: 2013-01-14, 接受日期: 2013-09-10

又磷酸化 Sch9 的 T570 位点, 下面称之为 PDK1 位点. Sch9 的 737 位苏氨酸也是位于其保守的 C 端疏水区中的磷酸化位点, 下面称之为 PDK2 位点. Sch9 单个 PDK2 位点的磷酸化就可以代表整个 C 端的磷酸化即 TORC1 的活性^[14], 原因是 TORC1 直接磷酸化了包括 Sch9 的 PDK2 位点在内的 C 端 6 个丝氨酸 / 苏氨酸残基^[6].

最近研究发现, 下调鞘脂(sphingolipid)合成延长出芽酵母的时序寿命, 部分机制是下调了 Pkh1-Sch9 途径导致染色体突变和重组率降低和胁迫耐受性增加^[15]. 时序寿命是指酵母细胞进入平台期(stationary phase, 或 G0 phase)后存活时间的长短^[16]. 时序衰老是指在酵母细胞进入平台期后随着时间的延长而不断衰老死亡的过程. 对 Sch9 的 PDK1 或 PDK2 位点磷酸化调控的研究, 有利于全面了解 Sch9 在细胞中的功能. 目前在营养和胁迫条件下, 以及时序衰老过程中对 Sch9 的 PDK1 或 PDK2 位点磷酸化调控的研究比较缺乏. 本文对 Sch9 的 PDK1 和 PDK2 位点在营养感受、胁迫应答、热量限制和时序衰老过程中的调控方式进行了研究.

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒和抗体

出芽酵母菌种 DBY746[MAT α leu2-3, 112 his3D1 trp1-289 ura 3-52 GAL+], BY4742 [MAT α his3-delta1 leu2-delta0 met15-delta0 ura3-delta0] 和 RCD398 [MAT α his3-delta1 leu2-delta0 met15-delta0 ura3-delta0 sch9::KAN (BY4742)] 为本实验室保存. TB50 [MAT α ; trp1, his3, ura3, leu2, rme1] 和 TS120-2d [MAT α ; sch9D::KanMX2 (TB50)] 由日内瓦大学 Robbie Loewith 教授赠送. 质粒 pYES2/NTA-SCH9-6HIS、pYES2/NTA-SCH9(T737A)-6HIS 和 pYES2/NTA 为本实验室保存. 质粒 pRS 416、pJU733 (pRS 416; SCH9-3HA)、pJU741 (pRS 416; SCH9 (T570A)-3HA)、pJU737 (pRS 416; SCH9 (T737A)-3HA) 和 pJU808 (pRS 416; SCH9 (T570A, T737A)-3HA) 均由日内瓦大学 Robbie Loewith 教授赠送. Anti-T570-P 抗体可以特异性识别 570 位苏氨酸残基磷酸化的 Sch9 蛋白^[17]. Anti-T737-P 抗体可以特异性地识别 737 位苏氨酸残基磷酸化的 Sch9 蛋白, 其制备与 anti-T570-P 的制备过程相似^[17], 只是将制备 anti-T570-P 所用 12 肽改为 10 肽 KFAGF (pT)

FVDE, pT 代表磷酸化的苏氨酸残基. Anti-HIS 和 anti-HA 抗体均购自博瑞克公司.

1.2 过量表达 Sch9 蛋白

诱导 Sch9 过量表达的培养基用已报道的配方准备^[18], 将培养基中碳源由 2%葡萄糖改为 2%蔗糖和 2%半乳糖以诱导 Sch9 过量表达. 于 2L 三角瓶中加入 1L 培养基并使 RCD398 (pYES2/NTA; SCH9-6HIS) 转化子细胞的起始浓度为 $A_{600}=0.01$, 置于 30℃ 气浴摇床中摇动培养. 于图 4a~d 中所示时间点收集一定量细胞并加入终浓度为 6%的 TCA, 放于冰上至少 10 min 以灭活细胞内所有的酶活性, 然后用预冷的水洗细胞 1 次, 用预冷的 100%丙酮洗细胞 2 次, 后续总蛋白提取和免疫印记分析按已报道的方法进行^[18].

1.3 生长实验、时序寿命测定

生长实验和时序寿命的测定, 按已报道的方法进行^[15, 18].

1.4 总蛋白提取和免疫印记分析

总蛋白提取和免疫印记分析按已报道的方法进行^[18]. 抗体 anti-T570-P (1:1 000 稀释) 的使用见已报道的方法^[17]. 抗体 anti-T737-P 按 1:1 000 稀释, 室温结合 2 h 后, 1×TBST 室温洗 3×15 min; 二抗羊抗兔按 1:2 000 稀释, 室温结合 1 h 后, 1×TBST 室温洗 3×15 min. 将 PVDF 膜与 ECL 底物在室温反应 3~5 min 后, 用 BIO-RAD 仪器拍照, 选择最佳图像. 免疫印迹的结果定量用 BIO-RAD 仪器完成. 统计学分析在 Microsoft Excel 软件中完成.

2 结 果

2.1 营养对 Sch9 的 PDK1 和 PDK2 位点磷酸化的调控

我们先前的研究已经对 anti-T570-P 抗体的特异性进行了鉴定, anti-T570-P 抗体可以特异性地识别 PDK1 位点磷酸化的 Sch9 蛋白^[17]. 由于雷帕霉素(rapamycin)可以特异性地抑制 TORC1 的活性^[6], 从而导致 Sch9 的 PDK2 位点磷酸化水平降低^[6], 而我们制备的 anti-T737-P 抗体特异识别未经雷帕霉素处理的 Sch9(图 1a), 因此 anti-T737-P 抗体可以特异性地识别 PDK2 位点磷酸化的 Sch9 蛋白.

通过利用这两个磷酸化位点特异性抗体, 检测了对数生长期细胞中碳源和氮源对 Sch9 的 PDK1 和 PDK2 位点磷酸化的影响. 结果显示, 在对数生长期, Sch9 的 PDK1 和 PDK2 位点高度磷酸化,

丧失碳源或氮源后, PDK2 位点磷酸化水平显著降低, 重新获得碳源或氮源后, PDK2 位点磷酸化重新恢复, 这与通过分析 Sch9 限制水解肽段间接检测 Sch9 C 端磷酸化变化的结果一致^[9]. 丧失或重新获得碳源后, Sch9 的 PDK1 位点磷酸化水平没有明显变化, 但是丧失氮源后, PDK1 磷酸化水平明显降低, 而重新获得氮源后, PDK1 磷酸化水平恢复(图 1c).

我们也检测了后代谢转换期(post-diauxic shift phase)细胞中碳源和氮源对 Sch9 的 PDK1 和 PDK2 位点磷酸化的影响. 如图 1b 所示, 后代谢转换期细胞中 Sch9 的 PDK1 和 PDK2 位点维持微弱的磷酸化水平, 转移到没有碳源的培养基中短暂培养后, 两个位点的磷酸化发生短暂的磷酸化水平降低. 而将细胞分别转移到含有 2%葡萄糖、2%半乳糖、2%蔗糖、2%麦芽糖、2%甘油或 2%乙醇作为

碳源的培养基中短暂培养后, Sch9 的 PDK1 和 PDK2 位点的磷酸化水平出现不同程度的恢复和增强, 其中, 以葡萄糖作为碳源短暂培养后, Sch9 的 PDK1 和 PDK2 位点的磷酸化增强最为显著(图 1b). 后代谢转换期的细胞被用来检测丧失/重新获得碳源或氮源后, Sch9 的 PDK1 和 PDK2 位点磷酸化的调控. 如图 1d 所示, 后代谢转换期细胞中 Sch9 的 PDK2 位点磷酸化丧失, 而 PDK1 位点仍然维持较弱的磷酸化水平. 此时将细胞转移到不含碳源的新鲜培养基中培养, PDK1 和 PDK2 位点的磷酸化没有变化, 但是加入碳源后, 两个位点的磷酸化水平开始增强(图 1d). 后代谢转换期细胞转移到不含氮源的培养基中培养, Sch9 的 PDK1 位点磷酸化水平降低, 而 PDK2 位点磷酸化无变化, 重新获得氮源后, 两个位点的磷酸化水平开始恢复和增强(图 1d).

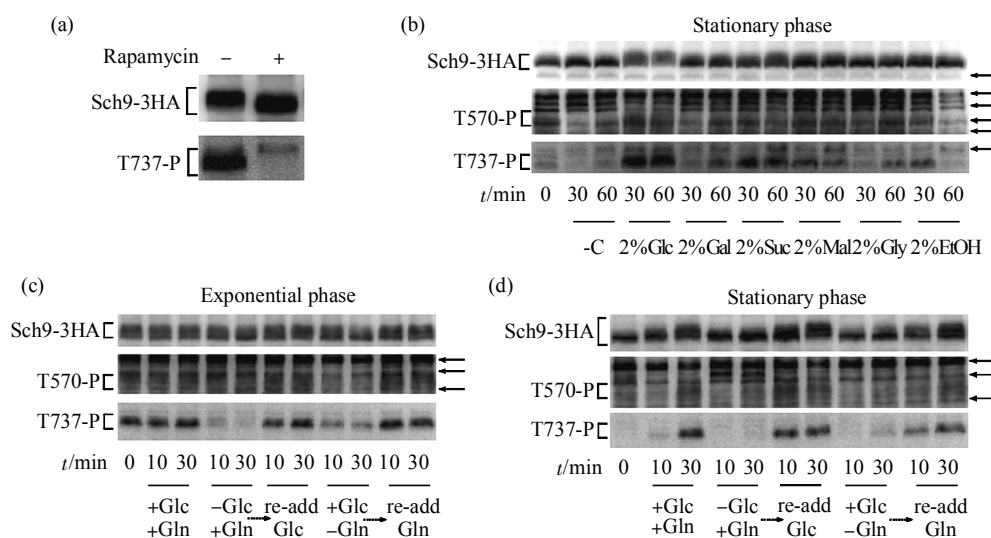


Fig. 1 Regulation of the phosphorylation of Sch9 PDK1 and PDK2 sites by Nutrients

Using anti-HA antibody to detect Sch9-3HA protein, anti-T570-P antibody to detect Sch9 PDK1 site phosphorylation and anti-T737-P antibody to detect Sch9 PDK2 site phosphorylation. (a) TS120-2d(Sch9 Δ) (pRS416; SCH9-3HA) cells were incubated from $A_{600} = 0.01$ to $A_{600} = 1$, and treated with 200 $\mu\text{g/L}$ rapamycin (final concentration) for 30 min. Arrows indicate non-specific bands. (b) TS120-2d(Sch9 Δ) (pRS416; SCH9-3HA) cells were incubated from $A_{600} = 0.01$ for 72 h and collected which was defined as time-point "0". Cells were gently centrifuged and re-suspended in equal volume of fresh medium without carbon source or with 2% glucose (Glc) or 2% galactose (Gal) or 2% sucrose (Suc) or 2% maltose (Mal) or 2% glycerol (Gly) or 2% ethanol (EtOH) and collected after 30 min and 60 min of incubation with shaking. "-C": No carbon source. Nitrogen source was Ammonia sulfate (NH_4^+). (c) TS120-2d(Sch9 Δ) (pRS416; SCH9-3HA) cells were incubated from $A_{600} = 0.01$ to $A_{600} = 1$ or (d) post-diauxic phase (72 h) and collected which is defined as time-point "0". Cells were centrifuged and re-suspended in equal volume of fresh medium or fresh medium without carbon source or nitrogen source and collect cells after another 10 min and 30 min of incubation with shaking. After this, carbon source or nitrogen source was added back to medium and collect cells after 10 min and 30 min of incubation with shaking. Glc: Glucose. Gln: glutamine. $\leftarrow$: Non-specific band.

图 1 中的结果显示, 无论在以糖酵解为主要代谢方式的对数生长期还是在以三羧酸循环为主要代谢方式的后代谢转换期, 碳源和氮源都可以调控 Sch9 的 PDK1 和 PDK2 位点的磷酸化。

2.2 胁迫对 Sch9 的 PDK1 和 PDK2 位点磷酸化的调控

重金属离子(氯化汞和氯化镍)处理对数生长期细胞后, Sch9 的 PDK2 位点丧失磷酸化, 但 PDK1 位点的磷酸化没有明显变化(图 2a)。这与通过分析 Sch9 限制水解肽段间接检测 Sch9 的 C 端磷酸化变化的结果一致^[9]。短暂的盐胁迫和氧化胁迫使得 Sch9 的 PDK2 位点出现短暂的磷酸化水平降低(图 2b), 这与相似条件下通过分析 Sch9 限制水解肽段间接检测 Sch9 的 C 端磷酸化变化的结果相符^[9]。短暂热胁迫处理导致 Sch9 的 PDK1 和 PDK2 位点丧失

磷酸化, 且 Sch9 蛋白条带的迁移率明显加快(图 2b), 其中, PDK2 位点磷酸化的变化与已报道的结果相符^[4]。最近的研究发现, 环境中乙酸调控出芽酵母的时序寿命, 敲除 SCH9 或 RAS2 基因后, 细胞对乙酸的耐受性增加^[20]。因此, 乙酸处理条件下, Sch9 的 PDK1 和 PDK2 位点的磷酸化调控可被检测。结果显示, 处于 pH 2.7 或 pH 4.0 的乙酸处理, 导致 Sch9 的 PDK1 和 PDK2 位点显著磷酸化水平降低, 而处于 pH 6.0 的乙酸处理不影响 Sch9 的磷酸化(图 2c)。此外, 高渗透压处理也会延长酵母的时序寿命^[21]。因此, 我们也检测了不同高渗透压处理对 Sch9 的 PDK1 和 PDK2 位点磷酸化的影响。结果显示, 高渗透压处理会导致 Sch9 的 PDK2 位点发生短暂磷酸化水平降低, 而不影响 PDK1 位点的磷酸化(图 2d)。

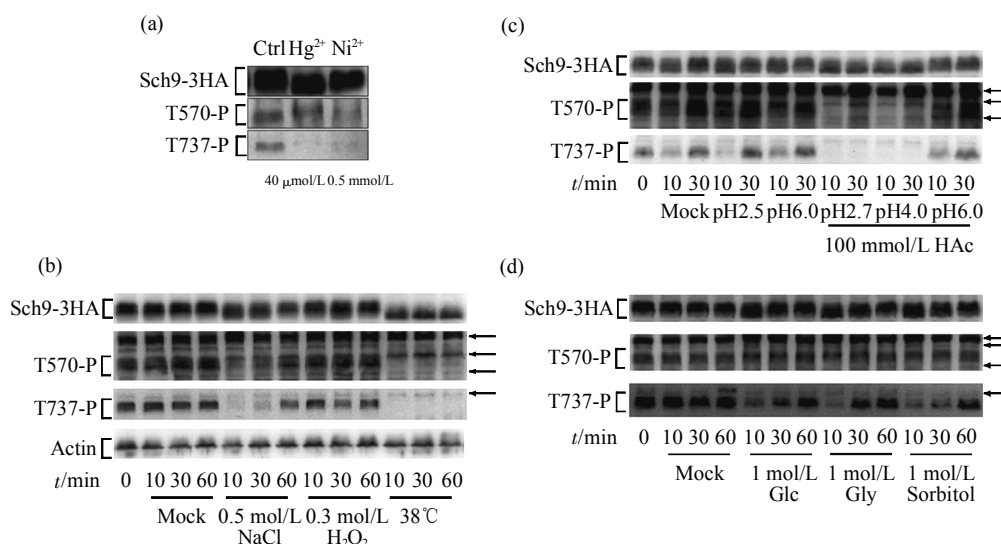


Fig. 2 Regulation of the phosphorylation of Sch9 PDK1 and PDK2 sites by Stresses

Antibodies used to detect Sch9-3HA protein and phosphorylation of Sch9 are the same as Figure 1. (a) TS120-2d (Sch9 Δ) (pRS416; SCH9-3HA) cells were incubated from $A_{600} = 0.01$ to $A_{600} = 1$ and treated with 40 $\mu\text{mol/L}$ HgCl_2 (final concentration) or 0.5 mmol/L NiCl_2 (final concentration) for 30 min. (b) Cells were incubated as in (a) to $A_{600} = 1$ and indicated treatments were applied and cells were collected after 10 min, 30 min and 60 min of incubation. Actin was protein extract loading control. (c) Cells were incubated as described in (a) to $A_{600} = 1$, centrifuged and transferred to fresh medium with pH adjusted to pH 2.5 (+/- 100 mmol/L HAc) or pH 6.0 (+/- 100 mmol/L HAc) or pH 4.0 without HAc and collected cells after 10 min and 30 min of incubation. HAc: Acetic acid. (d) Cells were incubated as described in (a) to $A_{600} = 1$ and indicated high osmolarity stresses were applied, including 1 mol/L glucose (Glc), 1 mol/L glycerol (Gly) and 1 mol/L sorbitol, and collected after 10 min, 30 min and 60 min of incubation with shaking. $\leftarrow$: Non-specific band.

图 2 中的结果显示, 营养丰富的对数生长期酵母细胞对胁迫处理很敏感, Sch9 的 PDK1 和 PDK2 位点磷酸化在胁迫应答过程中发挥作用。

2.3 Sch9 的 PDK1 和 PDK2 磷酸化位点在胁迫应答中的作用

图 2 中的结果显示, 胁迫处理调控 Sch9 的

PDK1 和 PDK2 位点的磷酸化变化. 为了研究 PDK1 和 PDK2 位点磷酸化变化的生理意义, 我们检测了 Sch9 的 PDK1 和 PDK2 位点在细胞生长和胁迫应答中的作用. 低盐胁迫处理条件下, 将生长 24 h 的细胞转移到葡萄糖作为碳源的固体培养基上生长, *sch9Δ*(pYES2/NTA)或 *sch9Δ* (pYES2/NTA; SCH9-T570A-6HIS)细胞表现出生长缺陷, 但野生型 BY4742 (pYES2/NTA) 或 *sch9Δ* (pYES2/NTA;

SCH9-6HIS)细胞没有生长缺陷(图 3a).将固体培养基中的碳源改为半乳糖后, 可诱导野生型 Sch9 蛋白或 Sch9(T570A)蛋白过量表达, 未加入胁迫或加入盐胁迫的 *sch9Δ* (pYES2/NTA) 或 *sch9Δ* (pYES2/NTA; SCH9-T570A-6HIS)细胞表现出更为显著的生长缺陷, 但野生型细胞没有生长缺陷 (图 3a).

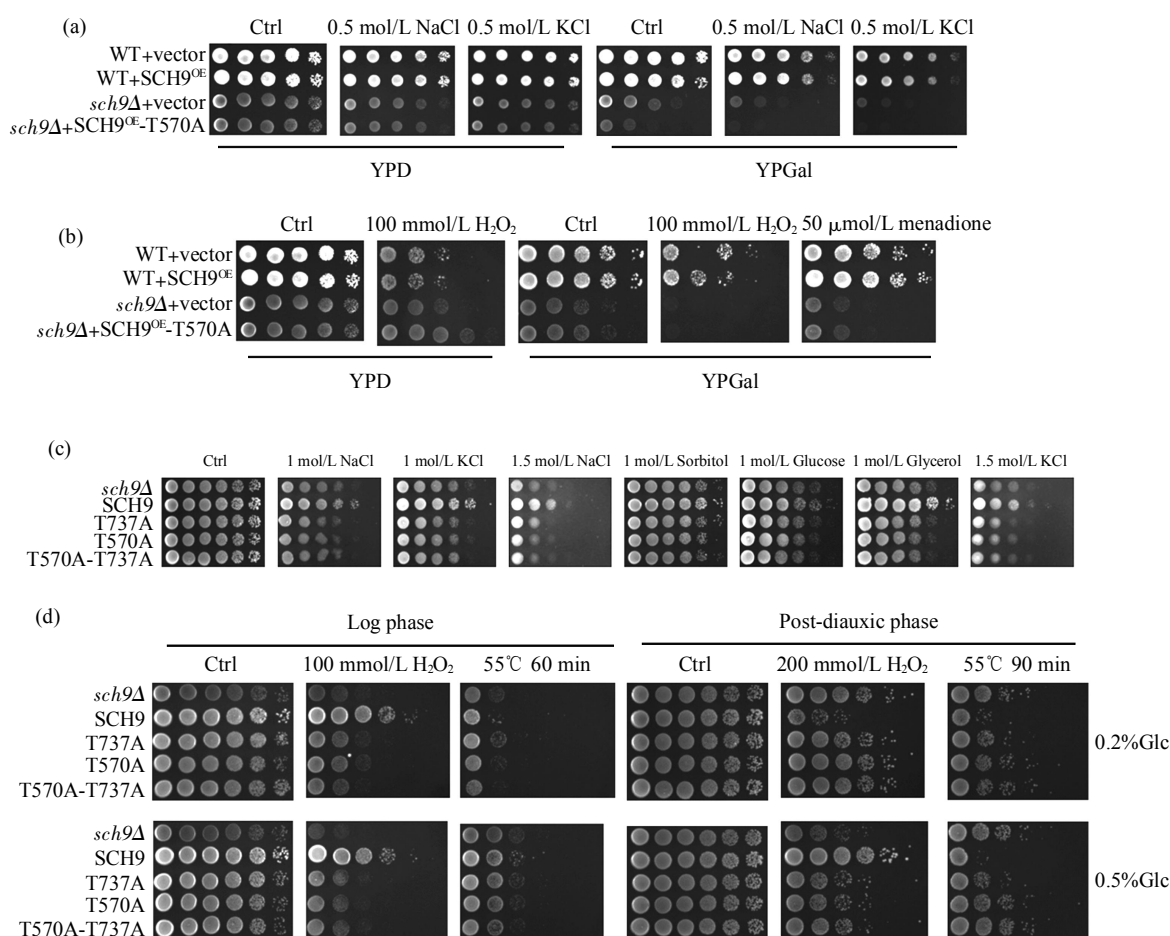


Fig. 3 Roles of the Phosphorylation of Sch9 PDK1 and PDK2 in Stress Response

(a) Cells BY4742 (pYES2/NTA), BY4742 (pYES2/NTA; SCH9-T570A-6HIS), RCD398 (*sch9Δ*) (pYES2/NTA) and RCD398 (*sch9Δ*) (pYES2/NTA; SCH9-T570A-6HIS) were incubated in SDC medium supplemented with 2% sucrose and 2% galactose as carbon source from initial concentration of $A_{600} = 0.01$ for 1 day (24 h). Collected $1 A_{600}$ unit cells and re-suspended in 1 ml water and serially diluted 10 fold. (b) Cells in (a) before dilution were treated by indicated concentration of hydrogen peroxide (H₂O₂) or menadione for 30 min. 5 μl of dilution was spotted onto indicated plates and allow to incubate for 2~3 days at 30°C. (c) Grow cells TS120-2d(Sch9Δ) (pRS 416), TS120-2d(Sch9Δ) (pRS 416; SCH9-3HA), TS120-2d(Sch9Δ) (pRS 416; SCH9 (T737A)-3HA), TS120-2d(Sch9Δ) (pRS 416; SCH9 (T570A)-3HA) and TS120-2d(Sch9Δ) (pRS 416; SCH9 (T570A, T737A)- 3HA) in SDC medium supplemented with 2% glucose or (b) 2% glucose or 0.5% glucose as carbon source from initial concentration of $A_{600} = 0.01$ to $A_{600} = 1$. Collect $1 A_{600}$ unit cells and re-suspended in 1 ml water or (d) treated with indicated hydrogen peroxide (H₂O₂) for 30 min at log phase and 60 min at post-diauxic phase. Cells were serially 10 fold diluted and 5 μl of dilution was spotted onto indicated plates in (c) or (d) and allow incubated at 30°C (control) or 55°C (heat shock) for indicated time and then transfer to 30°C for 2~3 days.

生长 24 h 的 *sch9Δ* (pYES2/NTA) 或 *sch9Δ* (pYES2/NTA; SCH9-T570A-6HIS) 细胞对氧化胁迫耐受性增加(图 3b). 将固体培养基中的碳源改为半乳糖后, 野生型 Sch9 或 Sch9(T570A) 可被诱导过量表达, 过量表达的 Sch9(T570A) 蛋白无法恢复 *Sch9Δ* 细胞的生长缺陷(图 3b).

生理条件下, 对数生长期的出芽酵母细胞的胁迫耐受性很低. 如图 3c 所示, *Sch9Δ* 细胞对盐胁迫或渗透压胁迫的耐受性比 *Sch9Δ* (PRS416; SCH9-3HA) 细胞低. 转化 SCH9(T737A) 或 SCH9 (T570A) 或 SCH9 (T570A, T737A) 进入 *Sch9Δ* 细胞后, 在盐胁迫或渗透压胁迫处理条件下, 无法恢复 *Sch9Δ* 的生长缺陷(图 3c). 对数生长期, *Sch9Δ* 细胞对氧化胁迫的耐受性低于 *sch9Δ* (PRS416; SCH9-3HA) 细胞, 转化 Sch9 (T737A) 或 Sch9 (T570A) 或 Sch9 (T570A, T737A) 蛋白进入 *Sch9Δ* 后, 在盐胁迫或渗透压胁迫处理条件下, 也无法恢复 *Sch9Δ* 的生长缺陷(图 3c). 热胁迫处理对于对数生长期的 *Sch9Δ* 或 *Sch9Δ* (PRS416; SCH9-3HA) 细胞的生长影响比较相似(图 3c). 热量限制对各种对数生长期细胞的胁迫耐受性影响不明显. 后代谢转换期的细胞对胁迫的耐受性与对数生长期细胞相比显著增加. 与 *Sch9Δ* (PRS416; SCH9-3HA) 细胞相比, *Sch9Δ*, 以及转化 SCH9 (T737A) 或 SCH9 (T570A) 或 SCH9 (T570A, T737A) 进入 *Sch9Δ*, 使得细胞对氧化胁迫或热胁迫的耐受性显著提高(图 3d). 热量限制可以显著提高后代谢转换期的 *Sch9Δ* (PRS416; SCH9-3HA) 细胞对氧化胁迫的耐受性, 但不能提高热胁迫的耐受性(图 3d).

图 3 中的结果显示, Sch9 的 PDK1 和 PDK2 磷酸化位点在酵母细胞对胁迫处理的应答过程中发挥重要作用.

2.4 Sch9 的 PDK1 和 PDK2 磷酸化在时序衰老过程中的调控

由于 Sch9 在调控酵母细胞时序衰老中具有关键作用^[3, 15, 22], 我们进一步分析了时序衰老过程中过量表达 Sch9 蛋白的 PDK1 和 PDK2 位点磷酸化的动态变化. 在过量表达条件下, 随着诱导时间的增加, Sch9 蛋白的量不断增加, 当细胞进入后代谢转换期, Sch9 蛋白的量达到峰值(图 4a~c). 过量表达后, Sch9 的 PDK1 位点磷酸化水平很高,

诱导约 70 h 后, PDK1 位点的磷酸化水平开始下降, 但仍然维持较高水平(图 4a~c). 计算 PDK1 位点的磷酸化水平与 Sch9 蛋白的量之间的比值, 结果如图 4b, d 所示, 与对数生长期时间点 35.5 h 相比, 其后的所有时间点细胞中, Sch9 PDK1 位点的磷酸化水平依次显著降低. 在时序衰老过程中, Sch9 PDK1 位点的磷酸化水平逐渐降低, 但仍然维持相对较高水平(图 4a~d).

在正常表达条件下(2%葡萄糖), 培养 15、18 和 22 h 3 个时间点的 *Sch9Δ* (pRS416; SCH9-3HA) 细胞中, Sch9 的 PDK1 位点高度磷酸化, 但从培养 28 h 时间点起, PDK1 位点一直处于丧失磷酸化状态, 直到 216 h 时间点, 其磷酸化水平开始恢复(图 4e, g). 热量限制(0.5%葡萄糖)条件下, 培养 15 h 和 18 h 两个时间点, Sch9 的 PDK1 位点高度磷酸化, 从 22 h 时间点开始磷酸化水平降低, 但很快在培养 72 h 时间点, PDK1 位点磷酸化水平开始恢复(图 4e, g).

正常表达条件下, 培养 15 h 和 18 h 时间点的野生型 TB50 (pRS416) 细胞中, Sch9 的 PDK2 位点高度磷酸化, 从 22 h 时间点开始, PDK2 磷酸化水平降低, 至 28 h 时间点丧失磷酸化(图 4f, g). 而热量限制条件下, 培养 15 h 时间点细胞中, Sch9 的 PDK2 位点仅发生微弱磷酸化, 18 h 时间点, PDK2 开始磷酸化水平降低, 至 22 h 时间点, PDK2 丧失磷酸化(图 4f, g).

图 4f 中的结果进一步确认了图 4e 中的实验结果, Sch9 的 PDK1 和 PDK2 位点的磷酸化变化在正常和热量限制条件下相似. 无论是正常条件还是热量限制条件下, Sch9 的 PDK2 位点丧失磷酸化后, 在时序衰老过程中, PDK2 位点的磷酸化水平不恢复. 图 4h 为正对照, 结果显示, 热量限制延长野生型出芽酵母的时序寿命.

图 4 中的结果显示, 在正常条件下(2%葡萄糖)的时序衰老过程中, Sch9 的 PDK1 位点磷酸化呈逐渐下降趋势, 直到平台期第 216 h 时间点才开始恢复, 而 Sch9 的 PDK2 位点始终处于丧失磷酸化状态. 在热量限制(0.5%葡萄糖)条件下的时序衰老过程中, Sch9 的 PDK1 位点磷酸化提前恢复, 而 Sch9 的 PDK2 位点仍始终处于丧失磷酸化状态.

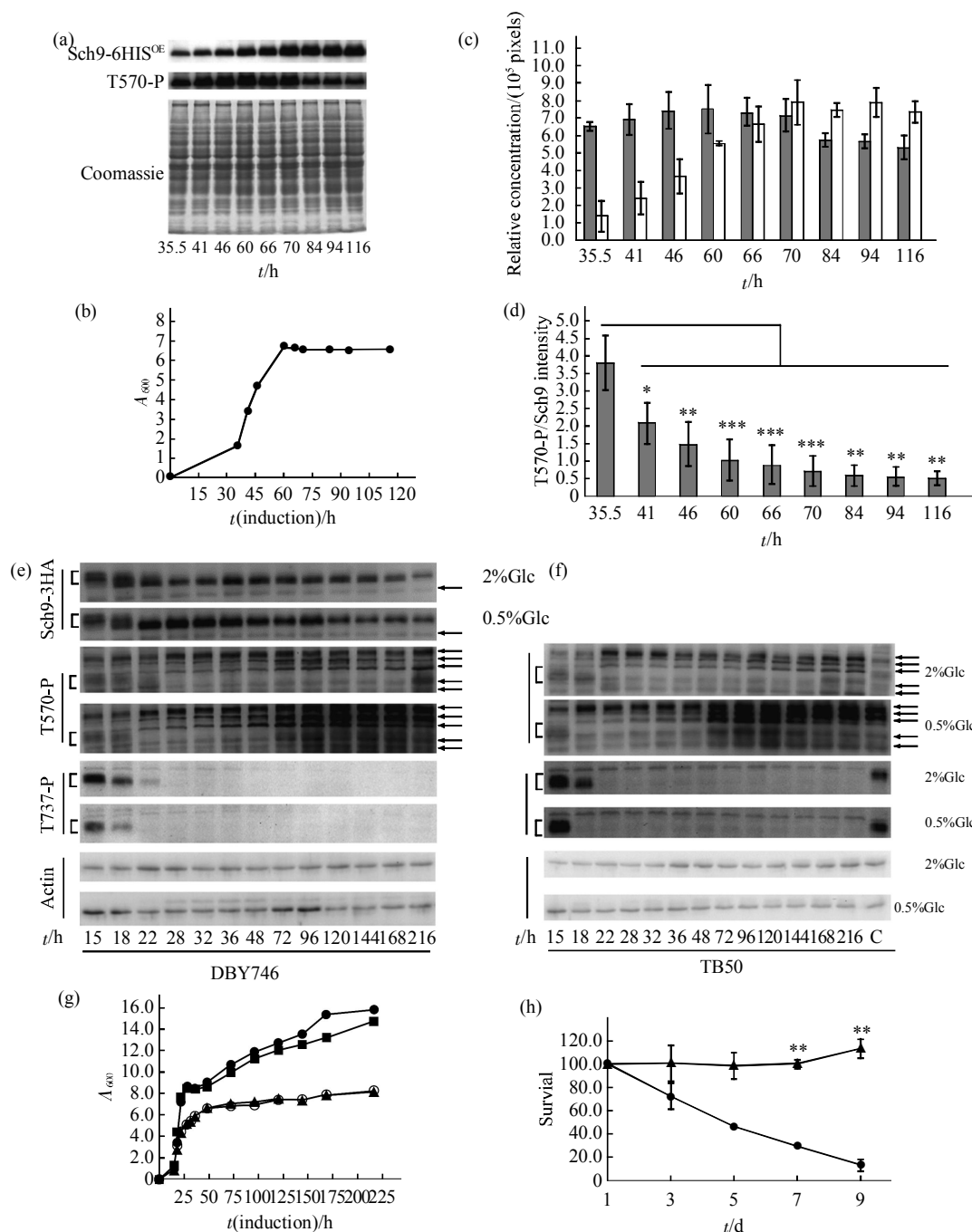


Fig. 4 Roles of the Phosphorylation of Sch9 PDK1 and PDK2 in chronological aging

(a) RCD398(Sch9Δ)(pYES2/NTA; SCH9-6HIS) cells were incubated in SDC medium supplemented with 2% sucrose and 2% galactose as carbon source from initial concentration of $A_{600} = 0.01$ and collected at time-point of 35.5, 41, 46, 60, 66, 70, 84, 94 and 116 h of incubation. Anti-HIS antibody was used to detect overexpressed Sch9-6HIS protein, and anti-T570-P antibody to detect PDK1 site phosphorylation. A Coomassie brilliant blue R250 stained gel as protein extract loading control. OE: Overexpression. Triplicate biological replicates were done. (b) A growth curve of RCD398(Sch9Δ)(pYES2/NTA; SCH9-6HIS) cells during 116 h of galactose-containing medium induction in (a). (c) Quantifying the immunoblots detected by anti-HIS antibody or anti-T570-P antibody, and the $\bar{x} \pm s$ was calculated. □: Sch9^{OE} protein; ■: T570-P phospho. (d) Calculate the ratio of Sch9 PDK1 phosphorylation level to Sch9-6HIS protein level. * $P < 0.05$, ** $P < 0.02$ and *** $P < 0.001$. Error bars: Standard deviation of triplicate biological replicates. (e) Grow TS120-2d(Sch9Δ)(pRS416; SCH9-3HA) cells or (f) TB50 (pRS416) in SDC medium supplemented with 2% glucose or 0.5% glucose as carbon source from initial concentration of $A_{600} = 0.01$ and collect cells at 15, 18, 22, 28, 32, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168 and 216 h of incubation. Use anti-HA antibody to detect Sch9-3HA protein, anti-T570-P antibody to detect PDK1 site phosphorylation and anti-T737-P antibody to detect PDK2 site phosphorylation. Actin protein level was used as protein extract loading control. (g) Growth curve of cells TS120-2d (Sch9Δ)(pRS416; SCH9-3HA) in (e) or TB50 (pRS416) in (f) were measured. C: 18 h time-point cells as control. ●—●: sch9Δ(pRS416; SCH9-3HA) 2% Glc; ▲—▲: sch9Δ(pRS416; SCH9-3HA) 0.5% Glc; ■—■: TB50 (pRS416) 2% Glc; ○—○: TB50 (pRS416) 0.5% Glc. (h) Chronological lifespan of DBY746 under normal condition (2% glucose) and calorie restriction (0.5% glucose) was detected as positive control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Glc: glucose. Error bars: Standard Errors of triplicate biological replicates. ●—●: DBY746 2%Glc; ▲—▲: DBY746 0.5%Glc. ←: Non-specific band.

3 讨 论

出芽酵母蛋白激酶 Sch9 参与了多种信号途径或细胞过程, 如细胞凋亡^[20]、细胞自噬^[23]、细胞大小的调控和核糖体合成^[24-26]、染色体重组和基因组稳定^[27]、寿命调控^[22, 28]等。因此, Sch9 的活性调控对细胞的生长和存活都非常重要。Sch9 的活性需要其激活环中的 PDK1 位点磷酸化和 C 端的 6 个丝氨酸 / 苏氨酸残基磷酸化^[6-8]。

以上结果进一步确认了已经报道的结果^[6], 在营养丰富的对数生长期, 雷帕霉素可以抑制 Sch9 的 C 端 PDK2 位点的磷酸化(图 1a)。并进一步确认了, Sch9 的 PDK2 位点磷酸化可以代表其整个 C 端的磷酸化水平^[14]。Sch9 的 C 端磷酸化受到 TORC1 控制, 以应对营养感受和胁迫应答^[6]。但是本文研究发现, Sch9 的 PDK1 位点也受到营养和胁迫的调控。不同碳源对 Sch9 的 PDK1 位点磷酸化影响大不相同(图 1b)。葡萄糖是出芽酵母喜好的碳源, 与其他非喜好碳源的培养基不同, 将处于后代谢转换期的细胞转移到含有葡萄糖的新培养基中, Sch9 的 PDK1 和 PDK2 位点磷酸化增强最明显(图 1b)。对数生长期细胞丧失氮源后, Sch9 的 PDK1 位点发生磷酸化水平降低, 重新获得氮源后磷酸化恢复(图 1c)。本文的研究还发现, 后代谢转换期的细胞中, Sch9 的 PDK2 位点丧失磷酸化, 如果将此细胞转移到含有丰富碳源和氮源的新培养基中, PDK2 位点的磷酸化很快恢复(图 1d)。将此细胞转移到不含碳源或氮源的新培养基中, PDK1 和 PDK2 位点磷酸化变化不明显, 再获得碳源或氮源后磷酸化又恢复和增强(图 1d)。

热胁迫短暂处理不但抑制了 TORC1 的活性^[14], 而且 Sch9 的 PDK1 也发生磷酸化水平降低(图 2b)。乙酸在低于其等电点的 pH 环境中不但抑制了 TORC1 的活性^[20], Sch9 的 PDK1 位点也发生磷酸化水平降低(图 2c)。已有报道高渗透压处理通过一种与热量限制相关的机制延长出芽酵母的时序寿命^[21]。本文研究发现, 高渗透压处理不影响 Sch9 的 PDK1 位点磷酸化, 但是会导致 PDK2 位点发生短暂磷酸化水平降低, 提示高渗透压延长寿命的部分机制可能是通过调控 Sch9 的活性实现(图 2d)的, 这与高渗透压处理通过一种与热量限制相关的机制延长出芽酵母的时序寿命相关^[21]。

以上结果也阐明了过量表达条件下和生理条件下, 时序衰老过程中, Sch9 的 PDK1 位点和 PDK2

位点磷酸化的动态变化(图 4)。在时序衰老过程中, 过量表达的 Sch9 的 PDK1 位点磷酸化逐渐降低, 但是 Sch9 的 PDK1 位点的相对磷酸化水平仍维持很高水平(图 4a~d)。生理条件下, Sch9 的 PDK1 位点磷酸化也是逐渐降低的(图 4e~g)。而 Sch9 的 PDK2 位点仅在对数生长期磷酸化, 当细胞进入后代谢转换期, 时序衰老过程中, PDK2 位点始终处于丧失磷酸化的状态, 该结果提示 TORC1 的活性完全丧失(图 4e~g)。热量限制会导致这一过程提前发生, 因为热量限制条件下细胞提前进入代谢转换期(图 4e~g)。热量限制条件下, Sch9 的 PDK1 位点在细胞即将进入平台期时重新恢复磷酸化(图 4e~g), 提示热量限制调控出芽酵母时序寿命还可能与 Sch9 的 PDK1 位点磷酸化调控密切相关的新机制。在细胞进入平台期后, 热量限制可能通过调控 Sch9 的 PDK1 位点磷酸化实现对出芽酵母时序寿命的调控。

致谢 感谢 Dr.R.Loewith 和 Dr.R.Dickson 赠予酵母菌种和质粒。感谢 Dr.R.Loewith 和 Dr.C.De Virgilio 提供菌种 TS120-2d 的生长表型信息。

参 考 文 献

- [1] Zaman S, Lippman S I, Zhao X, *et al.* How *saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Gen*, 2008, **42**(1): 27-81
- [2] Smets B, Ghillebert R, Snijder P, *et al.* Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 2010, **56**(1): 1-32
- [3] Longo Valter D, Shadel Gerald S, Kaeberlein M, *et al.* Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metabolism*, 2012, **16**(1): 18-31
- [4] Wullschlegel S, Loewith R, Hall M N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 2006, **124**(3): 471-484
- [5] Loewith R, Jacinto E, Wullschlegel S, *et al.* Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular Cell*, 2002, **10**(3): 457-468
- [6] Urban J, Souillard A, Huber A, *et al.* Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*, 2007, **26**(5): 663-674
- [7] Liu K, Zhang X, Lester R L, *et al.* The sphingoid long chain base phytosphingosine activates AGC-type protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae* including Ypk1, Ypk2, and Sch9. *J Biol Chem*, 2005, **280**(24): 22679-22687
- [8] Roelants F M, Torrance P D, Thorner J. Differential roles of PDK1- and PDK2-phosphorylation sites in the yeast AGC kinases Ypk1, Pkc1 and Sch9. *Microbiology*, 2004, **150**(10): 3289-3304
- [9] Biondi R M. Phosphoinositide-dependent protein kinase 1, a sensor of protein conformation. *Trends in Biochemical Sciences*, 2004,

- 29(3): 136–142
- [10] Alessi D R, Andjelkovic M, Caudwell B, *et al.* Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*, 1996, **15**(23): 6541–6551
- [11] Kobayashi T, Cohen P. Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositol 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem J*, 1999, **339**(2): 319–328
- [12] Alessi D R, James S R, Downes C P, *et al.* Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B. *Curr Biol*, 1997, **7**(4): 261–269
- [13] Alessi D R, Deak M, Casamayor A, *et al.* 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol*, 1997, **7**(10): 776–789
- [14] Takahara T, Maeda T. Transient sequestration of TORC1 into stress granules during heat stress. *Mol Cell*, 2012, **47**(2): 242–252
- [15] Huang X, Liu J, Dickson R C. Down-regulating sphingolipid synthesis increases yeast lifespan. *PLoS Genetics*, 2012, **8** (2): e1002493
- [16] Fabrizio P, Longo V. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. In *biological aging. methods in molecular biology*. Humana Press, 2007, **371**: 89–95
- [17] 朱德燕, 刘 军, 黄新河, 等. 酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)Sch9 蛋白激酶 PDK1 位点体内磷酸化的研究. *四川大学学报(自然科学版)*, 2009, **46**(4): 1125–1129
Zhu D Y, Liu J, Huang X H, *et al.* *J Sichuan Univ (Natural Science Edition)*, 2009, **46**(4): 1125–1129
- [18] 刘军, 闫磊, 朱德燕, 等. 酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)蛋白激酶 SCH9 激活环磷酸化调控胁迫应答. *四川大学学报(自然科学版)*, 2010, **47**(1): 185–191
Liu J, Li L, Zhu D Y, *et al.* *J Sichuan Univ (Natural Science Edition)*, 2010, **47**(1): 185–191
- [19] Hosiner D, Lempiäinen H, Reiter W, *et al.* Arsenic toxicity to *Saccharomyces cerevisiae* is a consequence of inhibition of the TORC1 kinase combined with a chronic stress response. *Mol Biol Cell*, 2009, **20**(3): 1048–1057
- [20] Burtner C R, Murakami C J, Kennedy B K, *et al.* A molecular mechanism of chronological aging in yeast. *Cell Cycle*, 2009, **8**(8): 1256–1270
- [21] Kaeberlein M, Andalis A A, Fink G R, *et al.* High osmolarity extends life span in *Saccharomyces cerevisiae* by a mechanism related to calorie restriction. *Mol Cell Biol*, 2002, **22**(22): 8056–8066
- [22] Fabrizio P, Pozza F, Pletcher S D, *et al.* Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science*, 2001, **292**(5515): 288–290
- [23] Yorimitsu T, Zaman S, Broach J R, *et al.* Protein kinase A and Sch9 cooperatively regulate induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 2007, **18**(10): 4180–4189
- [24] Jorgensen P, Nishikawa J L, Breitkreutz B J, *et al.* Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science*, 2002, **297**(5580): 395–400
- [25] Huber A, French S L, Tekotte H, *et al.* Sch9 regulates ribosome biogenesis via Stb3, Dot6 and Tod6 and the histone deacetylase complex RPD3L. *EMBO J*, 2011, **30**(15): 3052–3064
- [26] Jorgensen P, Rupeš I, Sharom JR, *et al.* A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes & Development*, 2004, **18**(20): 2491–2505
- [27] Madia F, Wei M, Yuan V, *et al.* Oncogene homologue Sch9 promotes age-dependent mutations by a superoxide and Rev1/Pol ζ -dependent mechanism. *J Cell Biology*, 2009, **186** (4): 509–523
- [28] Kaeberlein M, Powers R W, Steffen K K, *et al.* Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science*, 2005, **310**(5751): 1193–1196

Regulation of The Phosphorylation of Yeast Protein Kinase Sch9 Under Environmental Changes and During Chronological Aging*

LIU Jun, LÜ Lei, QIE Bei-Bei, LIU Ke**

(Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education,
College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract Budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) protein kinase Sch9 is homologous to the mammalian kinase S6K1. S6K1 is a substrate of mammalian target of rapamycin (mTOR) and phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) and relates to many diseases, including obesity, diabetes and cancer. Both Sch9 and S6K1 are important to the regulation of cell growth in response to different nutrient and stress factors. The residue T570 is a conserved phosphorylation site in the activation loop of Sch9, also called PDK1 site. Whereas another conserved phosphorylation site, T737, in the hydrophobic motif of C terminus is called PDK2 site. The phosphorylation of these two sites are important to Sch9 kinase activity. Upstream kinases Pkh1/2 phosphorylate the PDK1 site, while the Target of Rapamycin Complex 1 (TORC1) phosphorylates the PDK2 site. To better understand the intracellular function of protein kinase Sch9, it is important to elucidate the dynamics and regulation of the phosphorylation of PDK1 and PDK2 sites in Sch9 under different environmental condition. Using antibody that is specific for T570 site phosphorylated Sch9 or T737 site phosphorylated Sch9, we studied the regulation of the phosphorylation of PDK1 and PDK2 sites in Sch9 under different environmental factors and during chronological aging. Our results demonstrate the regulatory model of the phosphorylation of PDK1 and PDK2 sites in Sch9 during nutrient sensing, stress response, calorie restriction and chronological aging. The results also suggest a novel mechanism by which calorie restriction extends chronological lifespan that involves the regulation of the phosphorylation of Sch9 PDK1 site.

Key words Sch9, phosphorylation, PDK1, PDK2, S6K1, stress response, calorie restriction, chronological aging
DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00025

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30671181/C0603).

**Corresponding author.

Tel: 86-28-85415008, E-mail: kliu@scu.edu.cn

Received: January 14, 2013 Accepted: September 10, 2013