利用人源化酵母系统模拟 tomosyn 在囊泡运输过程中的功能

邵侃凯, 高晓冬*, 中西秀树*

江南大学生物工程学院, 无锡 214122

* 联系人, E-mail: xdgao@jiangnan.edu.cn; hidekinakanishi@hotmail.com

收稿日期: 2019-03-04; 接受日期: 2019-05-06; 网络版发表日期: 2019-05-16

摘要 突触囊泡融合是由 syntaxin-1A, synaptobrevin-2 和突触小体相关蛋白 25 (SNAP-25) 三个突触 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体 (SNARE) 蛋白共同介导完成的. 这些突触 SNARE 蛋白之间的相互作用受到包括 tomosyn 在内的多种辅助蛋白的调控. tomosyn 是一个 syntaxin 结合蛋白, 并且它是一个突触囊泡融合的负调控因子. 然而, tomosyn 的具体作用方式并不完全清楚. 本研究在酵母细胞中重构了 tomosyn 的抑制作用模型. SNARE 蛋白是一种保守的蛋白, 在酵母中, 突触 SNARE 蛋白的同源蛋白参与了分泌囊泡和细胞膜的融合. Sso1 是酵母中 syntaxin-1A 的同源蛋白. 在之前的实验中, 我们构建了一个 SNARE 嵌合体, 命名为 Sso1/187k-STX1A^{D133V}, 其中将 Sso1 的一部分替换为 syntaxin-1A 的相应部分. 这个 SNARE 嵌合体可以取代 Sso1 在酵母细胞中的功能. 过表达 tomosyn 对野生型酵母细胞的生长没有影响. 然而, tomosyn 的过表达干扰了含有 Sso1/187K-STX1A^{D133V} 的细胞的生长. 酵母双杂交试验结果表明, 在酵母细胞中, tomosyn 与 syntaxin 相互作用, 而不是与 Sso1 相互作用. 因此, 我们可以使用含有 Sso1/187K-STX1A^{D133V} 的酵母细胞作为分析 tomosyn 功能的工具.

关键词 酿酒酵母, tomosyn, syntaxin-1A, Sso1, SNARE

细胞分泌过程是通过囊泡胞吐过程来完成的, 而囊泡胞吐和胞吞过程是细胞内物质跨膜转运的重要途径, 是神经元细胞神经递质释放、分泌细胞分泌活动等细胞生理功能的基础. 囊泡启动是通过存在于细胞质、囊泡和细胞膜的蛋白之间发生的一系列相互作用来协调的^[1~3]. 囊泡启动的一个关键步骤是在细胞膜 SNARE 蛋白 syntaxin-1A、突触小体相关蛋白 SNAP-25 和囊泡蛋白 synaptobrevin-2 (也叫作 VAMP-2) 之间形成三聚 SNARE 复合物^[4~7]. 囊泡启动过程由多种辅助

蛋白高度调控, 如 Munc18, Munc13, tomosyn, rabphilin 和 complexin^[8~11]. 因为 SNARE 复合体的组装在囊泡融合过程中所起的中心作用, 详细了解哪些调节蛋白与 SNARE 构象周期相互作用以及该周期究竟是如何受到影响的是有必要的.

tomosyn 对囊泡融合过程起着至关重要的作用, 它最初是在大鼠脑细胞质中作为一种 syntaxin-1A 结合蛋白被发现的^[8]. tomosyn 在大脑中大量表达, 它的定位与突触前膜上的 syntaxin-1 部分重叠^[8]. tomosyn 是一种

引用格式: 邵侃凯, 高晓冬, 中西秀树. 利用人源化酵母系统模拟 tomosyn 在囊泡运输过程中的功能. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 659–670
Shao K K, Gao X D, Nakanishi H. The function of tomosyn in vesicle transport was simulated by the humanized yeast system (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2019, 49: 659–670, doi: [10.1360/N052018-00240](https://doi.org/10.1360/N052018-00240)

分子量大小为130 kD的蛋白质, 它包含一个带有WD40重复序列的N末端结构域和一个与VAMP2同源的C末端结构域^[9]. tomosyn所有亚型的C端都包含一个卷曲螺旋结构域, 包括16个完全保守的疏水性氨基酸和一个位于 α -螺旋中央0层的保守的精氨酸, 因此, tomosyn被归类为R-SNARE蛋白^[10,11]. 有人认为, 全长 tomosyn 只有在其R-SNARE区域存在的情况下才会在质膜上与SNAP-25和syntaxin-1A结合^[12]. 在 tomosyn 的N端区域中出现的WD40重复序列代表了 tomosyn 同源中最保守的区域^[10]. WD40重复序列是由40个氨基酸组成的保守核心组成, 通常以二肽GH(甘氨酸-组氨酸)开始, 以二肽WD(色氨酸-天冬氨酸)结束^[13]. tomosyn 的N端区域与其他WD40重复序列蛋白, 如黑腹果蝇蛋白^[14]、哺乳动物Lgl同源蛋白^[15]和酵母中的Sro7/Sro77蛋白^[16]具有高度的相似性. 最近的研究表明, tomosyn 的WD40区域能直接与SNAP-25和syntaxin相互作用, 增强了SNARE复合物的低聚作用并且抑制了突触传递^[17]. 因此, 不同的研究表明 tomosyn 具有双重抑制作用^[12,17]: C-末端螺旋区域及其N-末端WD40结构域均会与syntaxin和SNAP-25相互作用, 抑制SNARE复合体的形成.

在真核细胞中SNARE蛋白是高度保守的. 在酿酒酵母中, Sso1/2, Sec9和Snc1/2分别是Syntaxin-1A, SNAP-25和Synaptobrevin-2的同源蛋白^[4]. 由于胞外分泌是酵母的重要过程, 因此 *sso1 Δ sso2 Δ* 双突变株是不能生存的^[18]. 虽然突触小泡融合的调控机制比酵母胞外分泌融合的机制复杂很多, 但在这两者之间SNARE复合体的膜融合机制是保守的. 在之前的研究中, 我们成功构建了一株表达Sso1/STX1A^{D133V} (Sso1的SNARE区域替换成syntaxin-1A的SNARE区域并且Sso1的133位天冬氨酸突变成缬氨酸)的 *sso1/2* 双敲除突变株即 *sso1 Δ sso2 Δ (pRS314-SSO1_{pr}-Sso1/STX1A^{D133V})* (未发表结果), 这为在酵母中研究 tomosyn 与syntaxin之间的相互作用提供了一种可行的思路. 尽管我们知道 tomosyn 配合Munc13和syntaxin在囊泡成熟过程的中心阶段起作用, 并通过各种机制微调突触强度^[19], 但我们仍然缺乏必要的信息, 如是否存在除了SNARE蛋白外的其他蛋白质与 tomosyn 相互作用以及它们如何影响其活性, 因此, 我们有必要对 tomosyn 的功能进行进一步的研究.

为了更好地理解 tomosyn 发挥功能的确切分子机

制以及它参与各种突触可塑性过程, 在本研究中, 我们在 *sso1 Δ sso2 Δ (pRS314-SSO1_{pr}-Sso1/STX1A^{D133V})* 酵母中成功表达了 tomosyn 并且证明了其与syntaxin-1A相互结合而抑制人源化酵母的生长. 同时验证了syntaxin-1A的C端的整个 α 螺旋区域^[20] (氨基酸189到255)都是 tomosyn 结合所需要的, 这说明表达Sso1/187K-STX1A^{D133V} (详见质粒构建方法部分)嵌合体蛋白的 *sso1/2* 双敲除酵母菌株是一个更好的分析 tomosyn 功能的酵母模型.

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

酿酒酵母出发菌株为 *Saccharomyces cerevisiae* YPH499, 质粒及引物相关信息见表1. tomosyn 基因以HXO223和HXO224为引物以及人类基因组文库中的 tomosyn 质粒为模板PCR获得, 通过 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切, 连接到相同酶切的pRS426GAL1_{pr}载体上. pRS426GAL1_{pr}-SGFP2-tomosyn 质粒用于表达N端融合SGFP2标签的 tomosyn 蛋白. 为了构建这个质粒, SGFP2基因以HXS101和HXS102为引物以及pPICZB-SGFP2^[23]为模板通过PCR获得. 该基因片段由 *Spe* I 和 *Bam*H I 酶切并通过相同的酶切位点连接到pRS426GAL1_{pr}-tomosyn 质粒上. pRS426GAL1_{pr}-3HA-tomosyn 质粒用于表达N端融合3个HA标签的 tomosyn 蛋白. 为了构建这个质粒, 3XHA基因以HXS49和HXS50为引物以及pFA6a-3HA-His3MX6^[24]为模板通过PCR获得. 然后以获得的3XHA片段和HXO224为引物以及pRS426GAL1_{pr}-tomosyn 质粒为模板获得3HA-tomosyn 基因. 该基因片段由 *Sma* I 和 *Xho* I 酶切并通过相同的酶切位点连接到pRS426GAL1_{pr}质粒上. Sso1/187K-STX1A^{D133V} 基因通过融合PCR获得. 第一步, 以HXS78和HXO19为引物及人类大脑cDNA为模板PCR获得从189K这个氨基酸开始的syntaxin的SNARE区域. 第二步, 以第一步PCR产物和HXO15为引物及YPH499基因组为模板PCR获得融合C端SSO1区域的189K这个氨基酸开始的syntaxin的SNARE区域. 第三步, 以HXO14和第二步PCR产物为引物及pRS314-SSO1_{pr}-Sso1/STX1A^{D133V} 质粒为模板通过PCR获得Sso1/187K-STX1A^{D133V} 基因片段. 该基因片段通过 *Spe* I 和 *Xho* I 连接到pRS314-SSO1_{pr}质粒上获得

表 1 该研究所用的菌株、质粒和引物

Table 1 Lists of strains, plasmids and primers used in this study

菌株/质粒/引物	说明/基因型/序列(5'-3')	来源
菌株		
YPH499	<i>MATa, ade2-101, his3-Δ200, leu2-Δ1, trp1-Δ63, ura3-52</i>	[21]
<i>sso1Δsso2Δ(pRS316-SSO2)</i>	<i>MATa ura3-52 lys2-801_amber ade2-101 ochre trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1 sso1Δ::kanMX6 sso2Δ::his5⁺</i>	未发表
AH109	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	[22]
质粒		
pRS426GAL _{pr}	URA3标记多拷贝含有GAL1启动子	本研究
pRS426GAL1 _{pr} -tomosyn	URA3标记多拷贝含有GAL1启动子含有tomosyn基因	本研究
pRS426GAL1 _{pr} -3HA-tomosyn	URA3标记多拷贝含有GAL1启动子含有3HA-tomosyn基因	本研究
pRS426GAL1 _{pr} -SGFP2-tomosyn	URA3标记多拷贝含有GAL1启动子含有SGFP2-tomosyn基因	本研究
pRS314-SSO1 _{pr} -Sso1/187K-STX1A ^{D133V}	TRP1标记单拷贝含有SSO1启动子含有Sso1/187K-STX1A ^{D133V} 基因	本研究
pRS314-C1	TRP1标记单拷贝含有SSO1启动子含有C1基因	未发表
pRS314-C2 ^{D133V}	TRP1标记单拷贝含有SSO1启动子含有C2 ^{D133V} 基因	未发表
pGADT7 AD	LEU2标记多拷贝含有ADH1启动子含有GAL4 AD基因	TaKaRa
pGBKT7	TRP1标记多拷贝含有ADH1启动子含有GAL4 DNA-BD基因	TaKaRa
pGBKT7-53	TRP1标记多拷贝含有ADH1启动子含有GAL4 DNA-BD-p53基因	TaKaRa
pGADT7-T	LEU2标记多拷贝含有ADH1启动子含有GAL4 AD-SV40 largeT-antigen基因	TaKaRa
AD-STX1A	LEU2标记多拷贝含有ADH1启动子含有GAL4 AD-SYNTAXIN-1A基因	本研究
AD-SSO1	LEU2标记多拷贝含有ADH1启动子含有GAL4 AD-SSO1基因	本研究
AD-Sso1/187K-STX1A ^{D133V}	LEU2标记多拷贝含有ADH1启动子含有GAL4 AD-Sso1/187K-STX1A ^{D133V} 基因	本研究
AD-Sso1/STX1A ^{D133V}	LEU2标记多拷贝含有ADH1启动子含有GAL4 AD-Sso1/STX1A ^{D133V} 基因	本研究
AD-C1	LEU2标记多拷贝含有ADH1启动子含有GAL4 AD-C1基因	本研究
AD-C2 ^{D133V}	LEU2标记多拷贝含有ADH1启动子含有GAL4 AD-C2 ^{D133V} 基因	本研究
BD-tomosyn	TRP1标记多拷贝含有ADH1启动子含有GAL4 DNA-BD-TOMOSYN基因	本研究
引物		
HXO223	GAGCGGATCCGAGACCATGAGGAAATTCAA	本研究
HXO224	ATTCTCGAGTCAGAAGTGGTACCACTTCT	本研究
HXS49	GTGTCCCGGTATATAATGTCTTAAATTAACATCTT	本研究
HXS50	TTCCTGATGTTGAATTCCTGCACTGAGCAGCGTAATCTG	本研究
HXS78	ACAGACGTGGGGAAGCCAAGCAGGCTCTGAGCGAGAT	本研究
HXO19	TTTTCTGGCACTCTTGACGGCCTTCTTGGT	本研究
HXO14	AATAACTAGTAATCAAATGAGTTATAATAATCC	本研究
HXO15	ATAGCTCGAGTTAACGCGTTTTGACAACGG	本研究
HXS101	ACTAACTAGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	本研究
HXS102	ATGAGGATCCCCGGCCCCGGCCCCGGCCTTGACAGCTCGTCCATGC	本研究
HXS122	TGCCGAATTCGACGGCAAGGACCGAAGCCAGGAGCT	本研究
HXS124	CGGGATCCGTAGGAAATTCACATCAGGAA	本研究
HXS125	CAGGTCGACGGAAGTGGTACCACTTCTTAT	本研究
HXS126	CCGCTCGAGCTTTCTTCCGGCGCGCCTTGC	本研究
HXS319	TGCCGAATTCGACGGCAGTTATAATAATCCGTACCA	本研究
HXS320	CCGCTCGAGCTTGTCTTTCTTGTCTTTTCT	本研究

pRS314-SSO1_{pr}-Sso1/187K-STX1A^{D133V}质粒。AD-SSO1, -STX1A, -Sso1/187K-STX1A^{D133V}, -Sso1/STX1A^{D133V}, -C1, -C2^{D133V}及BD-tomosyn质粒为酵母双杂交实验所需质粒, 为了构建这些质粒, SSO1, Sso1/187K-STX1A^{D133V}, Sso1/STX1A^{D133V}, C1和C2^{D133V}基因以HXS319和HXS320为引物, 以314-SSO1, -Sso1/187K-STX1A^{D133V}, -Sso1/STX1A^{D133V}, -C1, -C2^{D133V}质粒为模板, 通过PCR获得。STX1A及tomosyn基因分别以HXS122和HXS126及HXS124和HXS125为引物, 以人类大脑cDNA及pRS426GAL1_{pr}-tomosyn为模板, 通过PCR获得。SSO1, STX1A, Sso1/187K-STX1A^{D133V}, Sso1/STX1A^{D133V}, C1和C2^{D133V}基因通过*Eco*R I 和*Xho* I 酶切位点连接到pGADT7 AD载体上, tomosyn基因通过*Bam*H I 和*Sal* I 酶切位点连接到pGBKT7载体上。

1.2 主要试剂

限制性内切酶、DNA T4连接酶及Ligation Mix连接酶购于大连TaKaRa公司; KOD-Plus Neo DNA聚合酶购于上海TOYOBO公司; PCR产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒及脱脂奶粉购于上海生工; Clarity™ Western ECL Substrate显色剂、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒和BCA蛋白浓度测定试剂盒购于碧云天生物技术有限公司(上海); Mouse anti-HA一抗、Goat anti-mouse IgG-HRP二抗购于北京金式金生物技术有限公司, PVDF膜购于美国伯乐公司; 5-FOA购于上海生工。无水甲醇、无水乙醇及异丙醇等其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.3 主要仪器

压力蒸汽灭菌器(立式)购于上海申安器械厂; 电泳仪购于北京六一仪器厂; pH计、电子天平购于上海梅特勒-托利多仪器公司; 无菌操作台、恒温培养箱购于上海三发科学仪器公司; 恒温摇瓶柜购于太仓强乐设备厂; PCR仪、移液枪购于Eppendorf公司; SDS-PAGE凝胶电泳仪、凝胶成像系统和半干电转仪购于美国伯乐公司; 紫外分光光度计、ImageQuant TMLAS 400 mini购置于美国GE公司; 荧光倒置显微镜购置于日本Nikon公司。

1.4 培养基及其他溶液配制

(i) SD培养基: YNB(Yeast Nitrogen Base without

Amino Acids) 6.7 g/L, 缺陷型粉末2 g/L^[25], 葡萄糖20 g/L, 琼脂粉20 g/L(固体培养基); 5-FOA(5-氟尿嘧啶)培养基是在相应的SD培养基中添加0.1%的5-FOA; SG培养基是用相同浓度的半乳糖代替葡萄糖; (ii) LB培养基: 胰蛋白胨(Tryptone) 10 g/L, 酵母抽提物(yeast extract) 5 g/L, 氯化钠(NaCl) 10 g/L, 琼脂粉(Agar) 20 g/L(固体培养基); (iii) YPAD培养基: 酵母抽提物(yeast extract) 20 g/L, 蛋白胨(Peptone) 10 g/L, 腺嘌呤(Adeline) 30 mg/L, 琼脂粉(Agar) 20 g/L(固体培养基), 葡萄糖20 g/L; (iv) 8 mol/L 尿素: 480.48 g尿素, 8.766 g NaCl, 25 mmol/L (pH 8.0), 加去离子水定容至1 L; (v) TBST溶液: 5 mol/L NaCl 30 mL, 1 mol/L Tris·HCl (pH 8.0) 10 mL, Tween20 500 μL, 加去离子水定容至1 L; (vi) 5%脱脂牛奶: 称取5 g脱脂奶粉, 用TBST定容至100 mL; (vii) 转膜缓冲溶液: 称取甘氨酸14.4 g, Tris·HCl 3.03 g, 量取无水甲醇200 mL, 加去离子水定容至1 L。

1.5 实验方法

(1) 细胞生长分析。将质粒pRS426GAL_{pr}和pRS426GAL_{pr}-tomosyn分别转化至YPH499以及不同的突变株细胞中, 在相应的氨基酸缺陷型平板上筛选阳性克隆。将阳性转化子在以葡萄糖为碳源的氨基酸缺陷型平板上划线培养48 h, 分别用牙签挑取不同的转化子在以葡萄糖为碳源的氨基酸缺陷型培养基中培养至 $A_{660}=1.0$, 离心收集细胞并分别以 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 和 5×10^3 个细胞每毫升重悬在无菌水中, 每个细胞悬浮液分别取5 μL在以葡萄糖和半乳糖为碳源的氨基酸缺陷型平板上点板, 在30℃培养2天, 观察细胞的生长情况。

(2) 蛋白质提取。将不同的细胞接种在5 mL以葡萄糖为碳源的相应的氨基酸缺陷型培养基中于30℃培养至 $A_{660}=1.0$, 收集细胞转移至30 mL以半乳糖为碳源的氨基酸缺陷型培养基中, 起始 $A_{660}=0.2$, 30℃培养至 $A_{660}=0.8 \sim 1.0$ 。不同转化子收集相同数量的细胞, 用去离子水洗细胞1次, 加入8 mol/L尿素缓冲溶液和蛋白酶抑制剂PMSE, 加玻璃珠冰上1 min, 振荡1 min(15个循环), 破碎细胞, 21500×g离心10 min取上清即为所提取蛋白。用BCA试剂盒测定蛋白质浓度。

(3) 蛋白质免疫印迹。电泳: 取100 μg蛋白样品上样跑电泳, 浓缩胶电压为80 V, 时间为30 min, 8%分离

胶电压为120 V, 时间为90 min; 转膜: 采用半干式转膜方式, 电压25 V, 电流1.0 A, 时间30 min; 封闭: 5%的脱脂奶粉封闭1 h; 孵育抗体: 一抗1:5000, 室温1 h; 二抗1:5000, 室温1 h; 显色: ECL显色液A和B各200 μ L混匀, 均匀涂于膜上, 用ImageQuant LAS4000mini显色。

(4) 酵母双杂交实验. 酵母双杂交系统可以进行两个蛋白相互作用分析, 可用一个已知蛋白去钓取与其结合的蛋白; 也可用来进一步验证两个蛋白之间的相互作用. 本实验应用Clontech第三代酵母双杂交系统, 并严格按照实验手册要求进行实验. 以下简单叙述实验步骤: 首先, AD和BD质粒转化AH109酵母, 在色氨酸亮氨酸双缺陷平板上筛选阳性克隆. 将阳性转化子在以葡萄糖为碳源的色氨酸亮氨酸双缺陷型培养平板划线培养48 h, 分别用牙签挑取不同的转化子在以葡萄糖为碳源的腺嘌呤色氨酸亮氨酸组氨酸四缺陷型平板上划线, 在30 $^{\circ}$ C培养2天, 观察细胞的生长情况, 阳性对照可以生长, 阴性对照不能生长, 若实验组可以在该四缺陷平板上生长则说明两个蛋白之间有相互作用可以结合, 反之则说明两个蛋白不能结合。

(5) 荧光定位实验. 将带有荧光蛋白的质粒pRS426GAL_{pr}-SGFP2-tomosyn分别转化到各突变菌株中, 涂布到相应的氨基酸缺陷型平板上. 待长出单菌落后, 挑取单菌落接种在以葡萄糖为碳源的相应的氨基酸缺陷型培养基中培养至 $A_{660}=0.8\sim1.0$, 离心收集1 mL细胞, 无菌水洗细胞一次, 转接到20 mL以半乳糖为碳

源的相应的氨基酸缺陷型培养基中培养至对数早期, 培养条件为30 $^{\circ}$ C. 离心收集1 mL细胞, 无菌水洗一次, 加入适量的无菌水重悬细胞并置于冰上, 在尼康荧光倒置显微镜下进行荧光定位观察。

2 结果

2.1 过表达tomosyn对野生型酵母的生长没有影响

在人体内, tomosyn通过与syntaxin结合调控SNARE复合体的形成从而调控神经递质的释放^[12]. 酵母细胞中存在tomosyn的同源蛋白sro7/sro77, 但是其C端结构明显不同, tomosyn有R-SNARE结构域而sro7/sro77没有^[16]. 尽管酵母是真核生物, 是研究真核生物的模式生物, 但是酵母细胞和哺乳动物细胞存在很大的差异, 如能否在酵母中检测到tomosyn的表达, tomosyn的表达是否会对酵母细胞的生长造成影响? 为了解决这些问题, 在诱导启动子GAL1_{pr}的控制下, 在酵母细胞中表达tomosyn. 在GAL1_{pr}调控下, 细胞在半乳糖为碳源的培养基中生长时tomosyn的表达被诱导, 在以葡萄糖为碳源的培养基中生长时tomosyn的表达被抑制. 如图1A所示, 在酿酒酵母YPH499细胞中可以检测到tomosyn蛋白的表达. 图1B点板结果显示, 过表达tomosyn对野生型酿酒酵母细胞的生长几乎没有影响。

图 1 tomosyn在野生型酵母YPH499中的表达. A: 带有pRS426GAL_{pr}或pRS426GAL_{pr}-3HA-tomosyn质粒的野生型酵母细胞在以葡萄糖为碳源的尿嘧啶缺陷培养基中培养随后收集菌体转接到半乳糖为碳源的培养基培养诱导表达融合HA标签的tomosyn蛋白, 培养条件为30 $^{\circ}$ C. 提取蛋白质使用Anti-HA抗体进行蛋白质免疫印迹分析; B: A中的细胞分别在葡萄糖和半乳糖为碳源的尿嘧啶缺陷平板上梯度稀释点板, 培养条件为30 $^{\circ}$ C(网络版彩图)

Figure 1 Expression of tomosyn in wild type yeast YPH499. A: Wild type yeast cells harbouring pRS426GAL_{pr} or pRS426GAL_{pr}-3HA-tomosyn were first cultured in SD-Ura media supplemented with glucose (Glc) then collect cells and shifted to SG-Ura media supplemented with galactose (Gal) to induce the HA tag fusion tomosyn protein, cultured in 30 $^{\circ}$ C. Their lysates were subjected to Western Blot analysis using anti-HA antibodies to detect HA fusion protein; B: the cells in (A) were cultured in SD liquid media and serial dilutions of the cultures were spotted onto SD plates supplemented with glucose (Glc) or galactose (Gal), cultured in 30 $^{\circ}$ C (color online)

2.2 过表达tomosyn抑制sso1Δsso2Δ(pRS314-SSO1_{pr}-Sso1/STX1A^{D133V})酵母的生长

在之前的实验中我们获得了一株人源化酵母菌株, 即表达Sso1/STX1A^{D133V}的sso1/2双敲除突变株(未发表). 为了验证tomosyn的功能, 我们在该菌株中表达tomosyn模拟其在神经元细胞神经递质释放过程中所起的抑制作用. 图2A点板结果显示, tomosyn的表达对sso1Δsso2Δ(314-SSO1)的生长几乎没有影响, 这与图1B结果一致. 图2B点板结果显示, tomosyn的表达对sso1Δsso2Δ(314-Sso1/STX1A^{D133V})的生长有较为明显的抑制作用. 图2C Western Blot结果显示, 在sso1Δsso2Δ(314-SSO1)和sso1Δsso2Δ(314-Sso1/STX1A^{D133V})菌株中tomosyn蛋白表达水平几乎没有差异. 图2D荧光结果显示, 在sso1Δsso2Δ(314-SSO1)和sso1Δsso2Δ(314-Sso1/STX1A^{D133V})菌株中tomosyn都有点状聚集并且没有明显差异. 这些结果显示tomosyn可能通过与Sso1/STX1A^{D133V}的结合而抑制酵母细胞的生长; 因此, 可以通过监测酵母的生长来分析tomosyn的功能.

2.3 tomosyn和syntaxin-1A可以在酵母中结合

在人体神经递质传递的过程中, tomosyn被报道会与syntaxin-1A结合并调控该过程. 为了进一步验证在酵母中tomosyn能否与syntaxin-1A或sso1结合, 分别构建了BD-tomosyn, AD-STX1A及AD-SSO1质粒并在双杂交酵母菌株AH109中验证结果. 如图3所示, 阳性对照(含有pGBKT7-53和pGADT7-T质粒的转化子)可以在四缺陷平板上很好的生长, 阴性对照(含有pGADT7 AD和pGBKT7质粒的转化子)在四缺陷平板上完全不能生长, 这说明利用双杂交系统来验证两个蛋白的相互作用是可行的. 图3结果显示, 含有AD-STX1A和BD-tomosyn质粒的转化子在四缺陷平板上可以生长尽管比阳性对照弱, 而含有AD-SSO1和BD-tomosyn质粒的转化子在四缺陷平板上完全不能生长. 该结果说明在酵母中tomosyn可以和syntaxin-1A结合而不能与Sso1结合, 这之前图2的结果(tomosyn对野生型酵母的生长几乎没有影响而抑制表达Sso1/STX1A^{D133V}的sso1/2双敲除突变株的生长)相一致.

2.4 Syntaxin-1A与tomosyn的结合需要syntaxin-1A的189~255位氨基酸

已知tomosyn在人体中会与syntaxin-1A结合, 并且在酵母中也有结合. 从图3结果可知, Sso1^{D133V}的-7到+8共16个相互作用层组成的SNARE区域被syntaxin-1A的SNARE区域替换形成的Sso1/STX1A^{D133V}可能与tomosyn结合从而抑制表达Sso1/STX1A^{D133V}的sso1/2双敲除突变株的生长. 为了进一步验证syntaxin-1A与tomosyn的结合需要syntaxin-1A的整个SNARE区域或者部分SNARE区域或者需要SNARE区域外的额外区域, 我们构建了表达不同Sso1/STX1A嵌合体蛋白的sso1/2双敲除突变株并在其中表达tomosyn, 观察tomosyn的表达对菌株生长的影响. 图4结果显示, 在5-FOA平板上移除316-SSO2质粒的情况下, 表达Sso1/187K-STX1A^{D133V}的sso1/2双敲除突变株可以生长. 这说明我们成功构建了表达Sso1/187K-STX1A^{D133V}的sso1/2双敲除突变株. 图5A为C1(Sso1的225~253位氨基酸序列被syntaxin-1A的227~255位氨基酸取代)、C2^{D133V}(Sso1的199~224位氨基酸序列被syntaxin-1A的201~226位氨基酸取代并且Sso1的D133氨基酸突变为V)及Sso1/187K-STX1A^{D133V}(Sso1的187~253位氨基酸序列被syntaxin-1A的189~255位氨基酸取代并且Sso1的D133氨基酸突变为V)质粒的结构示意图. 图5B点板结果显示, 在表达C1或者C2^{D133V}的sso1/2双敲除突变株中过表达tomosyn, 酵母的生长受到轻微的抑制并不明显, 在表达Sso1/187K-STX1A^{D133V}的sso1/2双敲除突变株中过表达tomosyn, 酵母的生长受到明显的抑制. 图5C双杂交结果显示, 含有AD-Sso1/187K-STX1A^{D133V}以及AD-Sso1/STX1A^{D133V}和BD-tomosyn质粒的转化子在四缺陷平板上可以生长, 而含有AD-C1以及AD-C2^{D133V}和BD-tomosyn质粒的转化子在四缺陷平板上完全不能生长. 说明Sso1/187K-STX1A^{D133V}以及Sso1/STX1A^{D133V}在酵母中能与tomosyn蛋白结合而C1以及C2^{D133V}不能与tomosyn结合. 图5D Western Blot结果显示, 在表达不同Sso1/STX1A嵌合体蛋白的sso1/2双敲除突变株中tomosyn蛋白表达水平几乎没有差异. 图5E荧光结果显示, 在表达不同Sso1/STX1A嵌合体蛋白的sso1/2双敲除突变株中tomosyn都有点状聚集并且没有明显差异. 这些结果显示tomosyn对表达不同Sso1/STX1A嵌合体蛋白的sso1/2双敲除突变株的生

图 2 tomosyn在表达Sso1/STX1A^{D133V}的sso1/2双敲除突变株中的表达。A: pRS426GAL_{pr}或pRS426GAL_{pr}-tomosyn质粒分别转化表达pRS314-SSO1的sso1/2双敲除突变株, 分别在葡萄糖和半乳糖为碳源的色氨酸尿嘧啶双缺陷平板上梯度稀释点板结果, 培养条件为30℃; B: pRS426GAL_{pr}或pRS426GAL_{pr}-tomosyn质粒转化表达Sso1/STX1A^{D133V}的sso1/2双敲除突变株, 分别在葡萄糖和半乳糖为碳源的色氨酸尿嘧啶双缺陷平板上梯度稀释点板结果, 培养条件为30℃; C: pRS426GAL_{pr}-3HA-tomosyn质粒分别转化表达pRS314-SSO1和表达Sso1/STX1A^{D133V}的sso1/2双敲除突变株, 在以葡萄糖为碳源的色氨酸尿嘧啶双缺陷型培养基中培养随后收集菌体转接到半乳糖为碳源的培养基培养诱导表达融合HA标签的tomosyn蛋白, 培养条件为30℃。提取蛋白质使用Anti-HA抗体进行蛋白质免疫印迹分析; D: pRS426GAL_{pr}-SGFP2-tomosyn质粒分别转化表达pRS314-SSO1和表达Sso1/STX1A^{D133V}的sso1/2双敲除突变株, 在以葡萄糖为碳源的色氨酸尿嘧啶双缺陷型培养基中培养随后收集菌体转接到半乳糖为碳源的培养基培养诱导表达融合SGFP2标签的tomosyn蛋白, 培养条件为30℃。收集适量的菌体观察荧光

Figure 2 Expression of tomosyn in *sso1Δsso2Δ(314-Sso1/STX1A^{D133V})*. A: pRS426GAL_{pr} or pRS426GAL_{pr}-tomosyn were transformed into *sso1Δsso2Δ(314-SSO1)* and the cells were cultured in SD-Ura-Trp liquid media and serial dilutions of the cultures were spotted onto SD-Ura-Trp plates supplemented with glucose (Glc) or galactose (Gal), cultured in 30 °C; B: pRS426GAL_{pr} or pRS426GAL_{pr}-tomosyn were transformed into *sso1Δsso2Δ(314-Sso1/STX1A^{D133V})* and the cells were cultured in SD-Ura-Trp liquid media and serial dilutions of the cultures were spotted onto SD-Ura-Trp plates supplemented with glucose (Glc) or galactose (Gal), cultured in 30 °C; C: *sso1Δsso2Δ(314-SSO1)* and *sso1Δsso2Δ(314-Sso1/STX1A^{D133V})* cells were transformed with pRS426GAL_{pr}-3HA-tomosyn and first cultured in SD-Ura-Trp media supplemented with glucose (Glc) then collects cells and shifted to SG-Ura-Trp media supplemented with galactose (Gal) to induce the HA tag fusion tomosyn protein, cultured in 30 °C. Their lysates were subjected to western blot analysis using anti-HA antibodies to detect HA fusion protein; D: *sso1Δsso2Δ(314-SSO1)* and *sso1Δsso2Δ(314-Sso1/STX1A^{D133V})* cells were transformed with pRS426GAL_{pr}-SGFP2-tomosyn and first cultured in SD-Ura-Trp media supplemented with glucose (Glc) then collects cells and shifted to SG-Ura-Trp media supplemented with galactose (Gal) to induce the SGFP2 tag fusion tomosyn protein, cultured in 30 °C. And cells were observed under the bright-field (BF) or fluorescent (GFP) microscopy

长抑制作用可能是通过与Sso1/STX1A嵌合体蛋白的结合抑制酵母SNARE复合体的形成而不是其本身

蛋白表达水平的差异或者在细胞中定位的差异引起的。

图 3 酵母双杂交实验分析tomosyn和syntaxin-1A或Sso1在酵母中的结合. pGBKT7-53和pGADT7-T, AD-STX1A和BD-tomosyn, AD-SSO1和BD-tomosyn, pGADT7 AD和BD-tomosyn, AD-STX1A和pGBKT7及pGADT7 AD和pGBKT7分别转化AH109酵母菌株, 在色氨酸亮氨酸双缺陷平板上获得的阳性转化子在以葡萄糖为碳源的腺嘌呤色氨酸亮氨酸组氨酸四缺陷平板上划线结果, 30℃培养

Figure 3 Analyzing the interaction of tomosyn with syntaxin-1A or Sso1 through yeast two-hybrid. pGBKT7-53 and pGADT7-T, AD-STX1A and BD-tomosyn, AD-SSO1 and BD-tomosyn, pGADT7 AD and BD-tomosyn, AD-STX1A and pGBKT7 or pGADT7 AD and pGBKT7 were transformed into AH109, the cells were streaked onto SD-Ade-Trp-Leu-His plates supplemented with glucose (Glc), cultured in 30 °C

图 4 Sso1/187K-STX1A^{D133V}在sso1/2双敲除突变株中的回补实验. pRS314-SSO1_{pr}(vector)和pRS314-SSO1_{pr}-Sso1/187K-STX1A^{D133V} (Sso1/187K-STX1A^{D133V})质粒分别转化含有pRS316-SSO2的sso1/2双敲除突变株, 在含有0.1% 5-FOA的葡萄糖为碳源的色氨酸缺陷平板上划线结果, 30℃培养

Figure 4 Complementary experiment of Sso1/187K-STX1A^{D133V} in sso1 and sso2 knockout strain. pRS314-SSO1_{pr} (vector) and pRS314-SSO1_{pr}-Sso1/187K-STX1A^{D133V} (Sso1/187K-STX1A^{D133V}) were transformed into *sso1Δsso2Δ*(316-SSO2), and the cells were streaked on SD-Trp plates supplemented with 5-FOA, cultured in 30 °C

3 讨论

本研究首次在酵母中过表达tomosyn蛋白并证明了tomosyn过表达对野生型酵母的生长几乎没有影响. 酵母中存在tomosyn的同源蛋白sro7/77, 他们在结构上与tomosyn有很大的同源性, 然而C端结构存在较大的差异, tomosyn的C端有与VAMP-2同源的SNARE区域而sro7/77则没有该区域^[16]. 因此, 它们在功能上会存在一些差异, tomosyn的过表达对酵母生长的影响需要进一步的验证. 图1结果显示tomosyn的过表达对野生型的酵母生长几乎没有影响而对表达Sso1/STX1A嵌合体蛋白的sso1/2双敲除酵母的生长有较为明显的抑

制作用, 这说明了tomosyn蛋白的表达对野生型酵母没有毒性, 因此, 我们可以利用酵母系统来研究tomosyn的功能.

由于SNARE融合机制的高度保守性, 我们猜测tomosyn同样会参与sso1Δsso2Δ(314-Sso1/STX1A^{D133V})酵母中的膜融合过程. 图2A和B结果显示, tomosyn的表达对sso1Δsso2Δ(314-Sso1/STX1A^{D133V})的生长有较为明显的抑制作用而对sso1Δsso2Δ(314-SSO1)的生长几乎没有影响. 图2C和D结果显示, tomosyn对sso1Δsso2Δ(314-Sso1/STX1A^{D133V})酵母生长的影响并不是由于蛋白表达水平以及荧光定位差异引起的. 结合图5C双杂交实验结果说明tomosyn在酵母中可以 and Sso1/

图 5 过表达 tomosyn 对表达不同 Sso1/STX1A 嵌合体蛋白的 *sso1/2* 双敲除突变株生长的影响。A: C1, C2^{D133V} 及 Sso1/187K-STX1A^{D133V} 质粒的结构示意图, 白色的部分表示来源于 SSO1 的区域, 灰色的部分表示来源于 syntaxin-1A 的区域; B: pRS426GAL_{pr} 和 pRS426GAL_{pr}-tomosyn 质粒分别转化表达 C1, C2^{D133V} 及 Sso1/187K-STX1A^{D133V} 的 *sso1/2* 双敲除突变株, 分别在葡萄糖和半乳糖为碳源的色氨酸尿嘧啶双缺陷型平板上梯度稀释点板结果, 培养条件为 30 °C; C: AD-Sso1/187K-STX1A^{D133V}, AD-Sso1/-STX1A^{D133V}, AD-C1 和 AD-C2^{D133V} 以及 BD-tomosyn 分别转化 AH109 酵母菌株, 在色氨酸亮氨酸双缺陷型平板上获得的阳性转化子在以葡萄糖为碳源的腺嘌呤色氨酸亮氨酸组氨酸四缺陷型平板上划线结果, 30 °C 培养; D: pRS426GAL_{pr}-3HA-tomosyn 质粒分别转化表达不同 Sso1/STX1A 嵌合体蛋白的 *sso1/2* 双敲除突变株, 在以葡萄糖为碳源的色氨酸尿嘧啶双缺陷型培养基中培养随后收集菌体转接到半乳糖为碳源的培养基培养诱导表达融合 HA 标签的 tomosyn 蛋白, 培养条件为 30 °C。提取蛋白质使用 Anti-HA 抗体进行蛋白质免疫印迹分析; E: pRS426GAL_{pr}-SGFP2-tomosyn 质粒分别转化表达 C1, C2^{D133V} 及 Sso1/187K-STX1A^{D133V} 的 *sso1/2* 双敲除突变株, 在以葡萄糖为碳源的色氨酸尿嘧啶双缺陷型培养基中培养随后收集菌体转接到半乳糖为碳源的培养基培养诱导表达融合 SGFP2 标签的 tomosyn 蛋白, 培养条件为 30 °C。收集适量的菌体观察荧光

Figure 5 The influence on *sso1* and *sso2* knockout strain harboring different Sso1/STX1A chimeras by overexpression of tomosyn. A: Schematic representations of C1, C2^{D133V}, and Sso1/187K-STX1A^{D133V}, white part indicated the region from SSO1, grey part indicated the region from syntaxin-1A; B: pRS426GAL_{pr} or pRS426GAL_{pr}-tomosyn were transformed into *sso1Asso2Δ* (314-C1), *sso1Asso2Δ* (314-C2^{D133V}) and *sso1Asso2Δ* (314-Sso1/187K-STX1A^{D133V}), the cells were cultured in SD-Ura-Trp liquid media and serial dilutions of the cultures were spotted onto SD-Ura-Trp plates supplemented with glucose (Glc) or galactose (Gal), cultured in 30 °C; C: AD-Sso1/187K-STX1A^{D133V}, AD-Sso1/-STX1A^{D133V}, AD-C1 and AD-C2^{D133V} or BD-tomosyn were transformed into AH109, the cells were streaked onto SD-Ade-Trp-Leu-His plates supplemented with glucose (Glc), cultured in 30 °C; D: pRS426GAL_{pr}-3HA-tomosyn were transformed into *sso1Asso2Δ* strains harboring different Sso1/STX1A chimeras and first cultured in SD-Ura-Trp media supplemented with glucose (Glc) then collects cells and shifted to SG-Ura-Trp media supplemented with galactose (Gal) to induce the HA tag fusion tomosyn protein, cultured in 30 °C. Their lysates were subjected to western blot analysis using anti-HA antibodies to detect HA fusion protein; E: *sso1Asso2Δ* (314-C1), *sso1Asso2Δ* (314-C2^{D133V}) and *sso1Asso2Δ* (314-Sso1/187K-STX1A^{D133V}) cells were transformed with pRS426GAL_{pr}-SGFP2-tomosyn and first cultured in SD-Ura-Trp media supplemented with glucose (Glc) then collects cells and shifted to SG-Ura-Trp media supplemented with galactose (Gal) to induce the SGFP2 tag fusion tomosyn protein, cultured in 30 °C. And cells were observed under the bright-field (BF) or fluorescent (GFP) microscopy

STX1A^{D133V}结合从而抑制酵母的生长。图3结果说明tomosyn不与酵母的Sso1结合,这也解释了为什么tomosyn的表达不会抑制野生型酵母的生长。在最初的研究中,已经观察到tomosyn可以抑制PC12细胞的胞外活动^[8]。虽然tomosyn被认为起着消极的作用^[26],但也有一些迹象表明,它还有着第二种积极的作用^[27],这一点仍有待评估。我们的结果与tomosyn对神经突触传递具有消极作用这一结果相一致,这也说明了我们的酵母系统可以用来研究tomosyn功能。

tomosyn最初是在大鼠脑细胞质中作为一种syntaxin-1A结合蛋白被发现的^[8]。tomosyn被认为可以将Munc18从syntaxin中取代,形成由syntaxin, SNAP-25和钙传感蛋白synaptotagmin组成的新型四蛋白复合物^[8]。tomosyn通过其SNARE区域与syntaxin结合,但是具体结合区域并没有详细的报道。在本研究中,我们对其结合区域进行了初步的探讨,发现不仅仅-7到+8层SNARE区域是结合所必须的,同样该SNARE区域前12个氨基酸存在的情况下syntaxin可以与tomosyn更好地结合,这说明syntaxin-1A的C端的整个 α 螺旋区域都

是tomosyn结合所需要的。

tomosyn的功能可以设想为两个步骤: 首先, tomosyn的SNARE区域可以作为一个空间信号标记, 将tomosyn招募到细胞膜的特定位置点, 这些位点富含syntaxin, 这种相互作用本身可以抑制SNARE复合物的形成和启动; 然后, 通过顺式核苷配合物的寡聚或与肌球蛋白或细胞骨架的相互作用, WD40区域与超变连接区域可以进一步控制在细胞膜上tomosyn的抑制作用。因此, 本研究构建的人源化酵母可以用来模拟tomosyn在神经突触传递过程所起到的抑制作用, 可以在该人源化酵母中分别表达tomosyn的各个区域来单独研究它们的功能。在这个酵母模型中, 可以通过酵母生长快慢来筛选能与tomosyn相互作用的蛋白。本文结果显示, syntaxin-1A的C端的整个 α 螺旋区域(氨基酸187~255)都是tomosyn结合所需要的, 我们成功构建了表达Sso1/187K-STX1A^{D133V}的sso1/2双敲除突变株, 由于tomosyn各个区域的功能及其相互作用关系的蛋白并没有研究的十分透彻, 因此我们可以利用该人源化酵母作为模型来分析tomosyn的功能。

参考文献

- 1 Becherer U, Rettig J. Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell Tissue Res*, 2006, 326: 393–407
- 2 Richmond J E, Broadie K S. The synaptic vesicle cycle: Exocytosis and endocytosis in *Drosophila* and *C. elegans*. *Curr Opin Neurobiol*, 2002, 12: 499–507
- 3 Südhof T C. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*, 2004, 27: 509–547
- 4 Fasshauer D, Sutton R B, Brunger A T, et al. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 15781–15786
- 5 Jahn R, Scheller R H. SNAREs—Engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7: 631–643
- 6 Sorensen J B. Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflugers Arch-Eur J Physiol*, 2004, 448: 347–362
- 7 Lu X, Zhang Y, Shin Y K. Supramolecular SNARE assembly precedes hemifusion in SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15: 700–706
- 8 Fujita Y, Shirataki H, Sakisaka T, et al. tomosyn: A syntaxin-1-binding protein that forms a novel complex in the neurotransmitter release process. *Neuron*, 1998, 20: 905–915
- 9 Groffen A J A, Jacobsen L, Schut D, et al. Two distinct genes drive expression of seven tomosyn isoforms in the mammalian brain, sharing a conserved structure with a unique variable domain. *J Neurochem*, 2005, 92: 554–568
- 10 Pobbati A V, Razeto A, Böddener M, et al. Structural basis for the inhibitory role of tomosyn in exocytosis. *J Biol Chem*, 2004, 279: 47192–47200
- 11 Hatsuzawa K, Lang T, Fasshauer D, et al. The R-SNARE motif of tomosyn forms SNARE core complexes with syntaxin 1 and SNAP-25 and down-regulates exocytosis. *J Biol Chem*, 2003, 278: 31159–31166
- 12 Gladychева S E, Lam A D, Liu J, et al. Receptor-mediated regulation of tomosyn-syntaxin 1A interactions in bovine adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem*, 2007, 282: 22887–22899

- 13 Smith T F, Gaitatzes C, Saxena K, et al. The WD repeat: A common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci*, 1999, 24: 181–185
- 14 Strand D, Jakobs R, Merdes G, et al. The *Drosophila* lethal(2)giant larvae tumor suppressor protein forms homo-oligomers and is associated with nonmuscle myosin II heavy chain. *J Cell Biol*, 1994, 127: 1361–1373
- 15 Müsch A, Cohen D, Yeaman C, et al. Mammalian homolog of *Drosophila* tumor suppressor lethal(2)giant larvae interacts with basolateral exocytic machinery in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell*, 2002, 13: 158–168
- 16 Kagami M, Toh-e A, Matsui Y. Sro7p, a *Saccharomyces cerevisiae* counterpart of the tumor suppressor l(2)gl protein, is related to myosins in function. *Genetics*, 1998, 149: 1717–1727
- 17 Sakisaka T, Yamamoto Y, Mochida S, et al. Dual inhibition of SNARE complex formation by tomosyn ensures controlled neurotransmitter release. *J Cell Biol*, 2008, 183: 323–337
- 18 Aalto M K, Ronne H, Keränen S. Yeast syntaxins Sso1p and Sso2p belong to a family of related membrane proteins that function in vesicular transport. *EMBO J*, 1993, 12: 4095–4104
- 19 Wojcik S M, Brose N. Regulation of membrane fusion in synaptic excitation-secretion coupling: Speed and accuracy matter. *Neuron*, 2007, 55: 11–24
- 20 Munson M, Chen X, Cocina A E, et al. Interactions within the yeast t-SNARE Sso1p that control SNARE complex assembly. *Nat Struct Biol*, 2000, 7: 894–902
- 21 Sikorski R S, Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1989, 122: 19–27
- 22 Moeini-Naghani I, Navaratnam D S. Yeast two-hybrid screening to test for protein-protein interactions in the auditory system. *Methods Mol Biol*, 2016, 1427: 95–107
- 23 Öberg F, Sjöhamn J, Conner M T, et al. Improving recombinant eukaryotic membrane protein yields in *Pichia pastoris*: The importance of codon optimization and clone selection. *Mol Membrane Biol*, 2011, 28: 398–411
- 24 Longtine M S, McKenzie III A, Demarini D J, et al. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1998, 14: 953–961
- 25 Nakanishi H, Li F, Han B, et al. Yeast cells as an assay system for *in vivo* O-GlcNAc modification. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1861: 1159–1167
- 26 Baba T, Sakisaka T, Mochida S, et al. PKA-catalyzed phosphorylation of tomosyn and its implication in Ca^{2+} -dependent exocytosis of neurotransmitter. *J Cell Biol*, 2005, 170: 1113–1125
- 27 Widberg C H, Bryant N J, Girotti M, et al. Tomosyn interacts with the t-SNAREs syntaxin4 and SNAP23 and plays a role in insulin-stimulated GLUT4 translocation. *J Biol Chem*, 2003, 278: 35093–35101

The function of tomosyn in vesicle transport was simulated by the humanized yeast system

SHAO KanKai, GAO XiaoDong & NAKANISHI Hideki

School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Synaptic vesicle fusion is mediated by SNARE protein, syntaxin-1A, synaptobrevin-2, and SNAP-25. The action of these synaptic SNARE proteins is regulated by various auxiliary proteins including tomosyn. Tomosyn is a syntaxin binding protein and is known as a negative regulator of synaptic vesicle fusion. However, the specific mode of action of tomosyn is not entirely clear. In the present study, we reconstitute the inhibitory action of tomosyn in yeast cells. SNAREs are conserved proteins and, in yeast, orthologues of synaptic SNARE proteins are involved in secretory vesicle fusion at the plasma membrane. Sso1 is a yeast orthologue of syntaxin-1A. Previously, we have constructed a chimeric SNARE, named Sso1/187K-STX1A^{D133V}, in which a part of Sso1 is replaced with the corresponding part of syntaxin-1A. This chimera can replace the function of Sso1 in yeast cells. Ectopic expression of tomosyn did not affect the growth in wild-type yeast cells. However, expression of tomosyn interfered with the growth in cells harboring Sso1/187K-STX1A^{D133V}. The result of yeast two-hybrid assay showed that tomosyn interacted with syntaxin, but not Sso1, in the yeast. Therefore, yeast cells harboring Sso1/187K-STX1A^{D133V} would be used as a tool to analyze the function of tomosyn.

***Saccharomyces cerevisiae*, tomosyn, syntaxin-1A, Sso1, SNARE**

doi: [10.1360/N052018-00240](https://doi.org/10.1360/N052018-00240)