

热激蛋白 Hsp90 在调控裂殖酵母异染色质区 基因沉默中的功能

李文珠, 余圣炜, 薛 钰, 李丹丹, 靳全文

(厦大学生命科学学院, 福建厦门 361005)

摘要: 鉴于高等生物中Hsp90与Argonaute蛋白的功能相关性, 研究了裂殖酵母中Hsp90/Swo1与Ago1蛋白之间的相互关系以及对异染色质区基因沉默的影响。结果表明, 裂殖酵母中Swo1蛋白通过与Ago1蛋白的相互作用, 可以稳定Ago1蛋白, 并且这种相互作用依赖于Swo1的N端和中央结构域以及Ago1的N端和PAZ结构域。在着丝粒的*otr*区和*imr*区, *swo1*⁺基因的突变会引起区域内基因沉默的解除, 并且与RNAi组分双突变后(*ago1Δ*或*dcr1Δ*), 基因沉默解除的效果加强。在交配型区, *swo1*⁺基因突变后也会引起显著的基因沉默解除现象。当*swo1*⁺基因突变后, 依赖于Tas3的人工异染色质区基因沉默解除。研究发现了裂殖酵母中热激蛋白Hsp90的新功能, 即参与异染色质区的基因沉默调控。

关键词: 裂殖酵母; 异染色质; 基因沉默; Hsp90/Swo1

中图分类号: Q75

文献标志码: A

文章编号: 2095-2783(2012)03-0190-6

Function of heat shock protein 90 (Hsp90) in heterochromatic gene silencing in fission yeast

Li Wenzhu, Yu Shengwei, Xue Yu, Li Dandan, Jin Quanwen

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: Given that Hsp90 functionally correlates with Argonaute in higher eukaryotes, we examined the interaction between Hsp90 (Swo1) and Ago1 and the function of Hsp90 on heterochromatic gene silencing in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. The results showed that Swo1 could stabilize Ago1 through interaction with Ago1 in fission yeast. The interaction between Swo1 and Ago1 depends on N domain and the central region of Swo1, as well as the N and PAZ domains of Ago1. The centromeric silencing was alleviated in the *swo1-26* mutant, but the silencing of reporter gene at telomere and rDNA regions remained unchanged. Double mutants of *swo1-26 dcr1Δ* and *swo1-26 ago1Δ* showed enhanced silencing defects at centromeric regions. In the mating type region, we observed a significant derepression of gene silencing in the *swo1-26* mutant. The artificial RITS complex-dependent silencing system was also defective in the *swo1-26* mutant. Our results found a new role of Hsp90 in gene silencing at heterochromatin regions in *S. pombe*.

Key words: fission yeast; heterochromatin; gene silencing; Hsp90/Swo1

基因沉默(gene silencing)是指生物体中特定基因由于种种原因不表达或者表达减少的现象。基因沉默现象

首先在转基因植物中被发现,接着在线虫、真菌、果蝇以及哺乳动物中陆续被发现。大量的研究表明,环境因

收稿日期: 2011-09-01

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20100121110003); 国家自然科学基金面上项目(30871376); 教育部科学技术研究重点项目(108076)

作者简介: 李文珠(1983-), 女, 博士研究生, 主要研究方向: 细胞生物学

通信联系人: 靳全文, 男, 教授, 主要研究方向: 细胞周期调控及表观遗传学, jinquanwen@xmu.edu.cn

子、发育因子、DNA 修饰、组蛋白乙酰化程度、基因拷贝数、位置效应、生物的保护性限制修饰以及基因的过度转录等都与基因沉默有关。但总的看来,基因沉默发生在两种水平上,一种是由于 DNA 甲基化、异染色质(heterochromatin)化以及位置效应等引起的转录水平上的基因沉默,即基因无法被顺利转录成相应的 mRNA;另一种是转录后基因沉默,是指基因在细胞核内能稳定转录,但在细胞质里却无相应稳定态 mRNA 存在,即靶标 mRNA 在基因转录后的水平上被特异性降解而使基因失活。基因沉默是真核生物基因表达调节的一种重要手段。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)作为一种转录及转录后水平的基因沉默机制^[1],近年来受到人们的广泛关注。

在染色体水平,基因沉默实际上是形成异染色质的过程,被沉默的基因区段呈现出染色质高度集缩状态。异染色质是真核生物染色体的一种表观遗传特征,它参与基因表达的调控、染色体的分离及基因组稳定性的维持。模式生物裂殖酵母(fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*)细胞核内有4个主要的异染色质区域:着丝粒区、端粒区、交配型区和 rDNA 区,其中着丝粒区主要由 *imr*、*otr* 和 *cnt 3* 部分构成。最近的研究越来越清楚地表明,在裂殖酵母中, RNAi 途径对其4个主要的异染色质区域中异染色质的形成和维持具有重要的作用^[2-3]。裂殖酵母中 RNAi 作用的关键蛋白 Ago1、Dcr1 和 Rdp1 由单个基因编码,这些蛋白对于异染色质区的基因沉默以及异染色质区特异性染色质蛋白修饰(如 H3K9me)都是必要的,但是这些蛋白的缺失不会使细胞致死^[4]。目前人们在裂殖酵母中已经发现了两个重要的参与 RNAi 的复合体:其一是 RITS 复合体(RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing complex),包括 Ago1、Chp1 和 Tas3 3种蛋白,是目前发现的主要的 RNAi 效应复合体;其二是 RDRC 复合体(RNA-directed RNA polymerase complex),包括 Rdp1、Hrr1 和 Cid12 3种蛋白^[5-6]。

大部分蛋白质在合成之后,必须折叠成它们最后的形态和高级结构以发挥正常功能。热激蛋白(又称热休克蛋白) Hsp90 是分子伴侣家族的重要一员,在辅助细胞内蛋白折叠和组装过程中起重要作用。它在细胞中表达丰度很高,可以参与许多重要细胞代谢活动^[7]。在裂殖酵母中, Hsp90 由 *swol1*⁺ 基因编码。

已有的研究显示在哺乳动物体内 Hsp90 能够维持 GERp95 蛋白的稳定性,并且二者具有相互作用^[8]。而 GERp95 蛋白本身就是哺乳类动物 RNAi 途径中的重要蛋白 Ago2^[9-10]。笔者研究了在裂殖酵母中 Swol1/Hsp90

与 Ago1 以及 RNAi 机制之间的联系,将为研究 Hsp90 在高等生物体的基因表达调控中的作用提供重要启示。

1 实验

1.1 材料

限制性内切酶以及工具酶 *Taq* DNA Polymerase, RNase A 和 T4 DNA Ligase 购自 Fermentas 公司。*Pfu* DNA Polymerase 购自天根公司。质粒提取及胶回收试剂盒购自上海生工有限公司。引物由英潍捷基贸易有限公司合成。鼠抗 anti-Flag mAb 购自 Sigma 公司,兔抗 anti-GFP 多克隆抗体由本实验室制备。

1.2 方法

1.2.1 裂殖酵母中蛋白的诱导表达

从筛选培养基上挑取包含重组质粒的新鲜酵母菌落,接种到 3 mL 相对应的液体筛选培养基 EMM+维生素 B₅ (终质量浓度为 5 μg/mL) 中,根据实验要求, 25 °C 或 30 °C 培养过夜。用 EMM 冲洗 7 次,然后按照体积比 1:25 的比例接种到 50 mL 液体 EMM 培养基中,根据实验要求,在 25 °C 或 30 °C 诱导表达 20 h。3 000 r/min 室温离心 5 min,沉淀于 -70 °C 贮存。

1.2.2 裂殖酵母中蛋白的制备

将收集的 50 mL 酵母菌体,加入大约 200 μL 玻璃珠,用快速裂解系统(fast prep)破碎 30 s。加入 500 μL 酵母蛋白裂解液,振荡后吸取裂解混合物。于 4 °C 以 4 000 r/min 离心 10 min,保留上清。

1.2.3 免疫共沉淀(co-IP)

在 500 μL 酵母蛋白裂解液加 2 μL 的 Flag 抗体 (0.5 mg/mL, Sigma), 4 °C 摇床孵育 1 h; 1 mL 酵母蛋白裂解液洗涤 40 μL protein A/G beads, 3 000 r/min 离心 1 min,除上清。将加入抗体的蛋白裂解液和 protein A/G beads 混合, 4 °C 摇床孵育 2 h; 3 000 r/min 离心 1 min,用裂解液重复洗涤 3 次;吸干 Eppendorf 离心管中的液体,加入 20 μL 的 2×SDS 上样缓冲液。煮沸 5 min,离心。

1.2.4 蛋白质印记(Western blot)

根据蛋白大小配置一定浓度的胶,按照浓缩胶电压 100 V,分离胶电压 120 V,进行 SDS-PAGE 分析。然后用湿法转膜仪 100 V 恒压转膜 1~3 h,可根据蛋白的大小调节转膜时间;之后用含 5% BSA 的 TBS 溶液室温封闭 2 h,接着用一抗工作液(TBS + 一抗) 4 °C 摇床过夜, TBS-T 冲洗 4 次,每次 5 min;二抗工作液(TBS + 二抗)室温孵育 1 h, TBS-T 冲洗 4 次,每次 10 min;在暗室条件下用 ECL 工作液孵育 PVDF 膜 20 s~10 min。暗室显影、定影,观察实验结果。

1.2.5 点滴试验(Drop test)

将已活化的野生型菌株和目的菌株接种到 YE5S 液体培养基中,在合适的温度下摇床培养过夜。在分光光度计中测菌液 A_{600} 。根据测得的细胞浓度用无菌水进行稀释,保证最高吸光度为 $A_{600}=0.2$ 。然后再从最高浓度稀释 10 倍、100 倍、1 000 倍。将稀释后的菌液按照浓度梯度分别滴在适当的固体培养基上。于适当温度下培养 3~4 d,期间经常观察其生长状况。

2 结果与讨论

2.1 裂殖酵母中 Hsp90 蛋白 Swo1 具有维持 RNAi 关键蛋白 Ago1 稳定性的功能

已有的研究显示,在哺乳类动物中 Hsp90 可以和 PAZ 蛋白家族的 GERp95 蛋白相互作用,并且 Hsp90 能够维持 GERp95 蛋白的稳定性^[8]。另外的研究证实 GERp95 蛋白是哺乳类动物 RNAi 途径中的重要蛋白 Ago2^[9-10]。笔者推测裂殖酵母中 Swo1(Hsp90)或许也有类似的功能。Western blot 结果显示,在 *swo1-26* 突变菌株中 Ago1 的蛋白水平相比野生型菌株中有显著降低(图 1),说明裂殖酵母中 Hsp90 也具有维持 Ago1 的稳定性的作用。另外,高温会造成裂殖酵母中 Ago1 蛋白的不稳定性(图 1)。

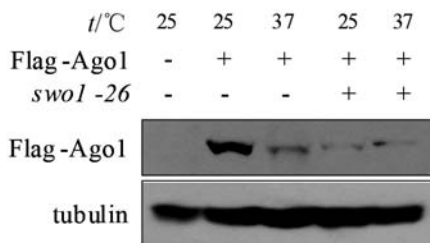


图 1 野生型菌株与 *swo1-26* 突变菌株的 Ago1 蛋白水平比较

Fig. 1 Comparison of Ago1 protein level in wild type and *swo1-26* mutant strains

2.2 裂殖酵母 Hsp90 蛋白影响异染色质区的基因沉默

在裂殖酵母中,着丝粒区主要由 3 个区域组成:*otr*、*imr*、*cnt*。研究显示 RNAi 机制对 *otr* 区和 *imr* 区基因沉默是必要的,而对 *cnt* 区基本不影响^[4]。上述实验发现 Swo1 蛋白能够影响裂殖酵母 RNAi 途径中的关键蛋白 Ago1 的蛋白水平,提示 Swo1 可能影响着丝粒区的基因沉默。笔者采用遗传学方法分析了 *swo1-26* 突变菌株中异染色质区的基因沉默情况。首先,利用插入到着丝粒 *otr* 区的 *ade6⁺* 基因作为报道基因,在此基础上构建 *swo1-26* 突变株,在 EMM5S(非选择性培养基)、EMM-ade(培养基中缺少 adenine)和 YE+low ade

(adenine 为正常添加量的十分之一,即 7.5 mg/L)等固体培养基上进行 drop test 实验以检测 *ade6⁺* 报道基因的表达情况。结果如图 2 所示,所有菌株在 EMM5S 培养基上生长良好;基因组内缺失 *ade6⁺* 基因的菌株,在 EMM-ade 培养基上无法生长,在 YE+low ade 培养基上菌落呈现红色;而可以表达 *ade6⁺* 基因的菌株,在 EMM-ade 培养基上生长状态良好,且在 YE+low ade 培养基上菌落呈现白色。着丝粒的 *otr* 区插入 *ade6⁺* 报道基因的菌株由于基因沉默效应,*ade6⁺* 基因的表达受到了抑制,故在 EMM-ade 培养基上生长状态欠佳,且在 YE+low ade 培养基上菌落呈现红色。*swo1-26* 突变菌株在 EMM-ade 培养基中长势比野生型好,并且在 YE+low ade 培养基上菌落呈现的红色比野生型的浅,说明 Swo1 突变可以解除 *ade6⁺* 基因沉默。

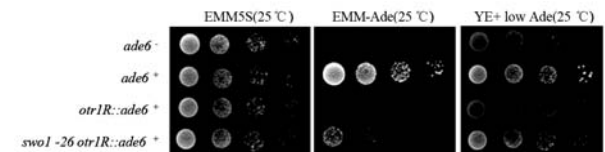


图 2 Drop test 检测 Swo1 对着丝粒 *otr* 区基因沉默的影响

Fig. 2 Effect of Swo1 on gene silencing at centromere *otr* region examined by drop test

采用插入到异染色质区的 *ura4⁺* 基因作为报道基因,在 EMM5S、EMM-ura(培养基中缺少 uracil)和 5-FOA 培养基(5-FOA 药物能杀死正常表达 *ura4⁺* 基因的酵母细胞)上进行 drop test 实验,以检测 *swo1-26* 突变是否也会影响裂殖酵母其他几个异染色质区的基因沉默。图 3 显示,在 *otr* 区和 *imr* 区带有报道基因的所有菌株在 EMM5S 培养基上生长良好;野生型菌株由于基因沉默效应,*ura4⁺* 基因的表达受到了抑制,在 EMM-ura 培养基上生长状态欠佳,而在反向选择培养基 5-FOA 上生长良好。*swo1-26* 突变菌株在 EMM-ura 培养基中长势均比野生型好,而在 5-FOA 培养基上生长状态不如野生型菌株,说明 *ura4⁺* 基因沉默已经得到解除。但是这种基因表达受到抑制的现象,在着丝粒的 *cnt* 区并未观察到。笔者发现,*swo1-26* 突变影响交配型区的基因沉默,但并不影响 rDNA 区和端粒区基因沉默。

另外,笔者还观察到 *swo1-26* 与 RNAi 双突变的菌株(*swo1-26 ago1Δ* 或 *swo1-26 dcr1Δ*)在 *otr* 区和 *imr* 区表现出更强的沉默解除,说明可能还有其他参与调控异染色质区的基因沉默的蛋白功能受到 Swo1 的影响。

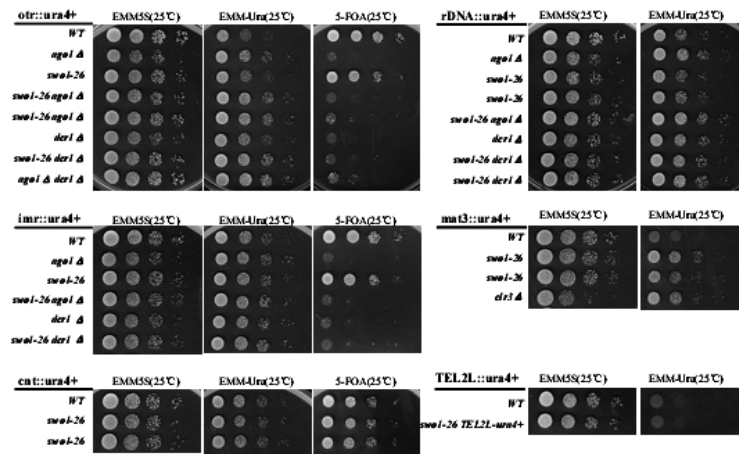


图3 Swo1 对异染色质区基因沉默的影响

Fig. 3 Effect of Swo1 on heterochromatic gene silencing

2.3 裂殖酵母 Hsp90 蛋白对于人工异染色质区基因沉默的影响依赖于 RITS 复合体的功能

Buhler 等^[11]利用 λN 与 BoxB 具有高亲和性的特点,人为地将与 λN 融合的 Tas3 (RITS 组分之一) 锚定到常染色质区的 *ura4⁺* 基因附近时,可以使该基因区域异染色质化,其结果导致原本表达活跃的 *ura4⁺* 基因沉默。这种人工的基因沉默现象依赖于整个具有完整功能的 RNAi 系统,并且需要异染色质区蛋白如 Ago1、Chp1、Swi6/HP1、Clr4/Suv39h 和 Sir2 等蛋白的参与。如果 Ago1 等蛋白缺失,就会去除这种基因沉默效应,恢复 *ura4⁺* 基因表达。由于笔者发现 Swo1 能够维持 RNAi 系统中的关键蛋白 Ago1 的稳定性,推测 Swo1 可能也会影响 Ago1 参与的人工异染色质区的基因沉默过程。

将 *swo1-26* 突变引入到同时带有 *ura4⁺::5BoxB* 和 *tas3⁺:: λN* 的菌株背景下,对 *ura4⁺* 基因表达作了遗传学分析(图4)。在野生型细胞中,与 λN 多肽融合的 Tas3 被插入到 *ura4⁺* 基因附近的 *5BoxB* 特异结合,引起 *ura4⁺* 临近区域异染色质化建立,进而导致活跃表达的 *ura4⁺* 基因沉默,表现为在 5-FOA 培养基上生长良好,与 *ura4⁺* 基因缺失(*ura4-D18*)的野生型菌株类似。而在获得的 3 株带有 *swo1-26* 突变的菌株中均表现出 *ura4⁺* 基因表达的恢复,即人工异染色质区基因沉默的解除。这说明 *swo1⁺* 基因的突变可能影响了 Ago1 的稳定性,进而破坏了 RITS 复合体的功能,影响了人工异染色质区的基因沉默。这一结果进一步支持 Swo1 在稳定异染色质结构中的重要作用。

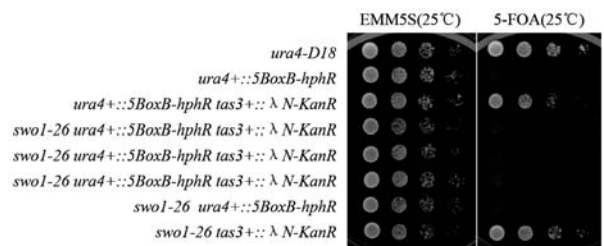


图4 人工异染色质区基因 *ura4-5BoxB* 的沉默依赖于 Swo1
Fig. 4 Artificial heterochromatic *ura4-5BoxB* silencing depends on Swo1

2.4 裂殖酵母中 Hsp90 蛋白 Swo1 与 Ago1 具有细胞内相互作用

Hsp90 是细胞中重要的分子伴侣之一,其中央区域通常为客户蛋白结合结构域^[12-13]。上述的实验结果已经证实了裂殖酵母中的 Swo1 具有维持 Ago1 稳定性的作用,暗示了 Swo1 与 Ago1 蛋白之间可能在细胞内具有相互作用。Swo1 可能通过这种直接结合来维持 Ago1 的稳定性。免疫共沉淀结果显示,在裂殖酵母中 Swo1 和 Ago1 的确存在于一个复合体中(图5)。

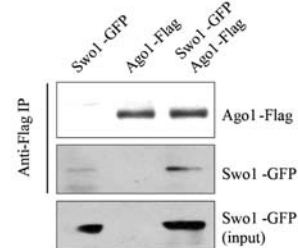
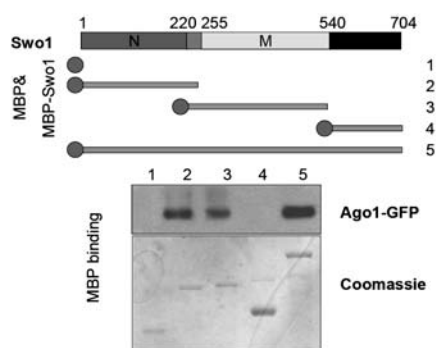


图5 Swo1 和 Ago1 在细胞内的相互作用 (co-IP)
Fig. 5 The interaction between Swo1 and Ago1 (co-IP)

2.5 Swo1 与 Ago1 的相互作用依赖于 Swo1 的 N 端和中央结构域

为了进一步明确 Swo1 与 Ago1 相互作用的具体细节, 根据 Swo1 和 Ago1 的结构特征, 分别构建了用于体外表达全长及部分截短的 Swo1 或 Ago1 的质粒, 在细菌中诱导表达后采用体外 pull-down 的方法来确定 Swo1 与 Ago1 中参与两蛋白相互作用的具体区域。

结果如图 6 所示, 纯化后的 MBP-Swo1^N, MBP-Swo1^M, MBP-Swo1 可以与来自酵母裂解液中的 Ago1-GFP 结合, 而 MBP-Swo1^C 则不能与 Ago1-GFP 结合。这一结果表明 Swo1 和 Ago1 的相互作用依赖于 Swo1 的 N 端和中央结构域。

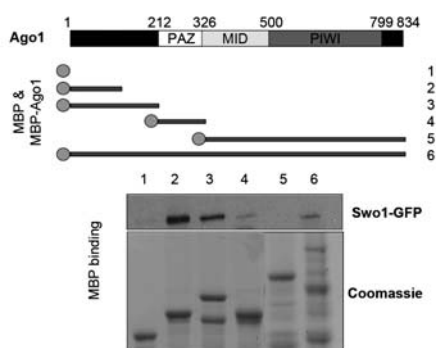


1—MBP; 2—MBP-Swo1^N; 3—MBP-Swo1^M;
4—MBP-Swo1^C; 5—MBP-Swo1

图 6 MBP-Swo1 与 Ago1-GFP 的体外相互作用分析

Fig. 6 Analyses of interaction between MBP-Swo1 and Ago1-GFP by *in vitro* pull-down and Western blot

2.6 Swo1 与 Ago1 的相互作用依赖于 Ago1 的 N 端和 PAZ 结构域



1—MBP; 2—MBP-Ago1^{1-120aa}; 3—MBP-Ago1^{1-215aa};
4—MBP-Ago1^{210-330aa}; 5—MBP-Ago1^{334-834aa}; 6—
MBP-Ago1

图 7 MBP-Ago1 与 Swo1-GFP 的体外相互作用分析

Fig. 7 Analyses of interaction between MBP-Ago1 and Swo1-GFP by *in vitro* pull-down and Western blot

同样采用体外 pull-down 的方法, 进一步分析 Ago1 蛋白中介导 Swo1 与 Ago1 相互作用的结构区域。结果如图 7 所示, 细菌表达并纯化后的 MBP-Ago1^{1-120aa}、MBP-Ago1^{1-215aa}、MBP-Ago1^{210-330aa} 和 MBP-Ago1 可以与来自酵母裂解液的 Swo1-GFP 结合, 而 MBP-Ago1^{334-834aa} 则不能与 Swo1-GFP 结合。这一结果表明 Swo1 与 Ago1 的相互作用依赖于 Ago1 的 N 端和 PAZ 结构域。

综合以上实验结果, 笔者确定了 Ago1 与 Swo1 蛋白具有细胞内的相互作用, 并且这种相互结合依赖于 Swo1 蛋白的 N 端和中央结构域以及 Ago1 蛋白的 N 端和 PAZ 结构域。

2.7 讨论

Hsp90 是机体重要的分子伴侣之一, 在细胞内 Hsp90 具有广泛的生物学功能, 其主要作用是维持细胞内环境稳态^[14]。在裂殖酵母中, 当 Swo1(Hsp90)突变后, 能抑制由 Wee1 激酶过量表达所带来的 G₂ 期阻断现象 (Wee1 激酶是细胞进入有丝分裂的负调控因子)^[15]。Mishra 等^[16]发现 Swo1 会影响肌球蛋白的功能以及胞质分裂时肌动蛋白环的装配。研究还表明 Swo1 很有可能参与葡萄糖/cAMP 信号通路的调控^[17]。

在高等生物中, Hsp90 通过与 GERp95(Ago2)蛋白的相互作用可以稳定 Ago2 蛋白的水平^[8]。笔者的研究结果表明在裂殖酵母中 Swo1 蛋白的突变会造成 Ago1 蛋白水平的降低, Swo1 蛋白也可以与 Ago1 蛋白相互结合来稳定 Ago1。Hsp90 的中部区域为客户蛋白的结合结构域, 并且该结构域在识别不同种类客户蛋白的过程中起着重要的作用^[18]。Hobman 等^[8]的研究显示, 哺乳动物中 Ago2 的 N 端介导了其 Hsp90 的相互作用。与此相一致, 裂殖酵母中的 Swo1 和 Ago1 之间的相互作用依赖于 Swo1 的 N 端和中央结构域, 以及 Ago1 的 N 端和 PAZ 结构域。这些结果提示 Hsp90 对 Argonaute 蛋白的这种保护机制在真核生物进化过程中很可能是保守的。

笔者通过遗传学实验发现 Swo1 参与了裂殖酵母中异染色质区基因沉默的调控。swo1⁺基因的突变能够解除着丝粒的 *otr* 和 *imr 2* 个区域以及交配型区的基因沉默。swo1-26 突变还能够解除人工异染色质区域的基因沉默, 进一步支持了 Swo1 是通过 RNAi 途径来调控异染色质区的基因沉默。但是, Swo1 几乎不影响其他的异染色质区(着丝粒的 *cnt* 区、rDNA 区和端粒区)的基因沉默。这也说明了作为分子伴侣的 Swo1 在不同的异染色质区, 其参与调控基因沉默的途径以及能力是不同的。

在着丝粒的 *otr* 和 *imr 2* 个区域, *swol*⁺ 基因的突变对基因沉默解除带来的效应没有 RNAi 组分单缺失 (*ago1Δ* 或 *dcr1Δ*) 时显著, 可能是由于当 *Swol* 突变后影响的一些调控基因沉默的因子其功能并没有完全丧失, 因此影响了 *Swol* 突变对基因沉默的效果; 而当某些 RNAi 通路上的重要蛋白如 *Ago1* 或 *Dcr1* 蛋白完全缺失时, RNAi 机制受到了严重影响, 促进了基因沉默。另外, 实验中观察到在 *swol*⁺ 基因的突变体与 RNAi 组分双突变体(*swol-26 ago1Δ* 或 *swol-26 dcr1Δ*)中, 着丝粒区报道基因的沉默解除比 *swol-26* 单突变或 RNAi 单缺失 (*ago1Δ* 或 *dcr1Δ*) 有所加强, 这种现象与 *Ago1* 和 *Dcr1* 双缺失 (*ago1Δ dcr1Δ*) 后产生的效果类似, 这说明 *Swol* 很可能同时影响了 RNAi 中的多个组分, 因此造成了叠加的效应。

swol-26 突变体在交配型区表现出十分强烈的基因沉默解除现象。在交配型区同时存在两套平行的基因沉默调控机制: 1) 由 *Atf1* 和 *Pcr1* (ATF/CREB 家族蛋白) 参与的信号途径; 2) RNAi 机制^[19]。*swol-26* 的突变可能同时影响这两条信号通路, 造成交配型区强烈的基因沉默解除现象。当然, 这种可能性还有待进一步的实验证实。另外, 在高温培养条件下, 细胞中的 *Ago1* 蛋白水平下降以及交配型区域基因沉默解除增强, 暗示高温可能参与调控裂殖酵母异染色质区的基因沉默。高温所引起的这些表型背后的机制仍需进一步的研究。

3 结 论

研究发现了裂殖酵母中热激蛋白 Hsp90(*Swol*)的新功能, *Swol* 蛋白通过与 RNAi 关键蛋白 *Ago1* 相互作用参与了异染色质区的基因沉默调控。生化分析发现 *Swol* 蛋白的 N 端和中央结构域, 以及 *Ago1* 蛋白的 N 端和 PAZ 结构域, 介导了两种蛋白之间的相互作用。*Swol* 蛋白通过这种相互作用来维持 *Ago1* 蛋白的稳定性, 进而影响异染色质区的基因沉默, 起到调控基因表达的作用。

[参考文献](References)

[1] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.

[2] Grewal S, Jia S. Heterochromatin revisited [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2007, 8: 35-46.

[3] Moazed D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence [J]. *Nature*, 2009, 457(7228): 413-420.

[4] Volpe T A, Kidner C, Hall I M, et al. Regulation of heterochromatic

silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi [J]. *Science*, 2002, 297(5588): 1833-1837.

[5] Verdel A, Jia S, Gerber S, et al. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex [J]. *Science*, 2004, 303(5658): 672-676.

[6] Motamedi M R, Verdel A, Colmenares S U, et al. Two RNAi complexes, RITS and RDRC, physically interact and localize to noncoding centromeric RNAs [J]. *Cell*, 2004, 119(6): 789-802.

[7] McClellan A J, Xia Y, Deutschbauer A M, et al. Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches [J]. *Cell*, 2007, 131(1): 121-135.

[8] Tahbaz N, Carmichael J B, Hobman T C. GERP95 belongs to a family of signal-transducing proteins and requires Hsp90 activity for stability and Golgi localization [J]. *The Journal Biological Chemistry*, 2001, 276(46): 43294-43299.

[9] Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, et al. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi [J]. *Cell*, 2002, 110(5): 563-574.

[10] Hock J, Weinmann L, Ender C, et al. Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells [J]. *EMBO Reports*, 2007, 8(11): 1052-1060.

[11] Buhler M, Verdel A, Moazed D. Tethering RITS to a nascent transcript initiates RNAi- and heterochromatin-dependent gene silencing [J]. *Cell*, 2006, 125(5): 873-886.

[12] Prodromou C, Roe S M, O'Brien R, et al. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone [J]. *Cell*, 1997, 90(1): 65-75.

[13] Young J C, Moarefi I, Hartl F U. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2001, 154(2): 267-273.

[14] 李娟, 杨惠, 周元国. 热激蛋白 90 与热激应答[J]. *生命的化学*, 2008, 28(3): 299-301.

Li Juan, Yang Hui, Zhou Yuanguo. Heat-shock protein 90 and heat-shock response [J]. *Chemistry of Life*, 2008, 28(3): 299-301. (in Chinese)

[15] Aligue R, Akhavan-Niak H, Russell P. A role for Hsp90 in cell cycle control: Wee1 tyrosine kinase activity requires interaction with Hsp90 [J]. *The EMBO Journal*, 1994, 13(24): 6099-6106.

[16] Mishra M, D'Souza V M, Chang K C, et al. Hsp90 protein in fission yeast *Swol1p* and UCS protein *Rng3p* facilitate myosin II assembly and function [J]. *Eukaryot Cell*, 2005, 4(3): 567-576.

[17] Alaamery M A, Hoffman C S. *Schizosaccharomyces pombe* Hsp90/Git10 is required for glucose/cAMP signaling [J]. *Genetics*, 2008, 178(4): 1927-1936.

[18] Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(20): 10832-10837.

[19] Jia S, Noma K, Grewal S. RNAi-independent heterochromatin nucleation by the stress-activated ATF/CREB family proteins [J]. *Science*, 2004, 304(5679): 1971-1976.