

# 不同营养条件下酿酒酵母中线粒体相关的内质网膜的蛋白质组鉴定

孙 岩, 王恬静, 万翠红

(华中师范大学, 湖北 武汉 430079)

**摘要:** 线粒体相关的内质网膜(mitochondria-associated endoplasmic reticulum, MAM)是细胞的重要组成部分,在细胞生理活动中起着关键的调控作用,但目前还缺少对酵母中该组分蛋白质的系统性分析。本研究对不同营养条件下酵母中 MAM 蛋白进行了全面的蛋白质组学鉴定,最终得到 1 486 个 MAM 组分蛋白。差异蛋白分析发现,在饥饿条件下,共有 176 个差异蛋白,其中上调蛋白 39 个,下调蛋白 137 个;在过营养条件下,共有 158 个差异蛋白,其中上调蛋白 155 个,下调蛋白 3 个。功能富集分析结果表明,这些蛋白主要参与糖的生物合成、脂肪酸代谢、类固醇生物合成代谢、内质网的蛋白质加工、氨基酸的生物合成等过程。相互作用网络分析发现了固醇合成和蛋白质加工的具体通路,以及关键的 MAM 组分蛋白,如 MCD4 和 CNE1 等。本研究不仅鉴定到新的 MAM 组分蛋白,还为进一步探索其生物学功能提供了重要的数据支持和理论依据。

**关键词:** 内质网;线粒体;饥饿;蛋白质折叠;脂质代谢

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2024)06-0832-11

DOI: 10.7538/zpxb.2024.0125

CSTR: 32365.14.zpxb.2024.0125

## Proteomic Study of Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum in *Saccharomyces cerevisiae* under Different Nutritional Conditions

SUN Yan, WANG Tian-jing, WAN Cui-hong

(Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

**Abstract:** The mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) is an essential component of eukaryotic cells. It is involved in many critical cellular functions, such as bioenergetics, mitophagy, apoptosis, and calcium signaling, regulating cellular physiological activities. The MAM proteins of mammalian cells have been extensively studied. However, as an important model organism of eukaryotic single cell, only a few MAM proteins were found in yeast, named endoplasmic reticulum and mitochondria encounter structures (ERMES). There is currently a lack of systematic analysis of MAM protein in yeast. Here, the MAM proteins in *Saccharomyces cerevisiae* that grow under different nutritional conditions were comprehensively identified by using Percoll gradient differential centrifugation and label-free quantification mass spectrometry technique. Finally, 1 486 MAM component proteins are obtained, including well-known MAM proteins and more new components. The functional enrichment analysis of these proteins showed that they are mainly enriched in protein synthesis and transport, glucose metabolism, and lipid metabolism. They are located primarily in the endoplasmic reticulum, mitochondria, Golgi apparatus, and other organelles.

Their molecular functions are mainly related to transferase, oxidoreductase activity, proton-transporting ATPase activity, and protein and lipid binding. KEGG metabolic pathway analysis indicated that these proteins participate in sugar biosynthesis, fatty acid metabolism, steroid biosynthesis, endoplasmic reticulum protein processing, amino acid biosynthesis, and other processes. Under different nutritional conditions, the proteins related to mitochondrial division and fusion were identified, such as CAF4, FIS1, DNMI, FZO1 and UGO1. Except for regulatory effects on the structure of mitochondrial, the MAM proteins also have other functions, such as vesicular transport (SSO2, GOS1, VAM6), ion transport (RSN1, YVC1, ATP18), sterol synthesis (ERG1, ERG2, ERG3) and autophagy (ATG39, ATG15, ATG22). Through differential expression analysis, 176 differentially expressed proteins (DEPs) are found under starvation conditions, including 39 up-regulated and 137 down-regulated proteins; 158 DEPs are found under overnutrition conditions, including 155 up-regulated and 3 down-regulated proteins. By analyzing the protein-protein interaction network of DEPs, it was found that they are mainly involved in the biosynthesis of sugars, proton-transporting ATPase activity, GPI-anchored protein biosynthesis, steroid biosynthesis, protein processing in the endoplasmic reticulum, and mitochondrial redox reactions. The pathways and critical proteins involved in sterol synthesis and protein processing were determined, such as MCD4 and CNE1. This research provides significant data resources for further exploring the biological functions of MAM proteins and helps to understand their roles during the process of cellular stress.

**Key words:** endoplasmic reticulum; mitochondria; starvation; protein folding; lipid metabolism

线粒体和内质网是真核细胞中2个重要的细胞器。1959年, Copeland和Dalton<sup>[1]</sup>首次通过电子显微镜发现内质网和线粒体这2个细胞器密切接触。随后,科学家们利用不同的实验方法证实了内质网和线粒体之间存在相互交流和通讯<sup>[2-4]</sup>。1990年, Vance等<sup>[5]</sup>通过分离得到这种内质网与线粒体相互偶联的膜组分,并命名为线粒体相关的内质网膜(mitochondria-associated endoplasmic reticulum, MAM)。线粒体外膜的5%~20%与内质网相互关联<sup>[6]</sup>,且膜上的MAM蛋白质会参与脂质合成与转运、钙离子稳态、线粒体形态调控、内质网应激、细胞自噬以及细胞凋亡等重要的生物学功能<sup>[7-10]</sup>。

目前,在哺乳动物细胞中,很多MAM区域的蛋白组分已经被鉴定和广泛研究<sup>[11-13]</sup>。如,定位于内质网膜上的1,4,5-三磷酸肌醇受体IP3R可与线粒体外膜上的阴离子通道蛋白VDAC1发生相互作用,通过葡萄糖调节蛋白Grp75介导钙离子从内质网到线粒体的转运<sup>[14-15]</sup>;线粒体融合蛋白(mitofusins, MFNs)可作为桥接蛋白连接2个细胞器,调控线粒体的融合过程<sup>[16]</sup>。而在单细胞真核模式生物酵母中,该类蛋白质则很少被报道。长期以来,在酵母的内质网与线粒体之间只发现了内质网-线粒体接触复合物(endoplasmic

reticulum and mitochondria encounter structures,ERMES)<sup>[17]</sup>,该复合物包括Mmm1、Mdm34、Mdm12和Mdm10四个核心组分,介导磷脂组分在线粒体与内质网之间的转运,且只在真菌中高度保守,不存在于哺乳动物细胞中<sup>[18-20]</sup>。随后,研究发现了ERMES的调控蛋白Gem1,在酿酒酵母中敲除Gem1会导致线粒体形态的改变以及线粒体DNA的丢失<sup>[21]</sup>。近期又发现了ERMES的调控蛋白Emr1,即只有7ku的线粒体外膜蛋白,在裂殖酵母中,Emr1基因的敲除会导致线粒体形态异常以及ERMES聚集点数目的显著减少<sup>[22]</sup>。研究表明<sup>[23]</sup>,酵母中仍存在新的未知MAM蛋白。

近年来,蛋白质组学技术被应用于MAM蛋白的大规模鉴定。Ma等<sup>[24]</sup>利用Percoll梯度离心和蛋白质组学技术,在糖尿病模型小鼠大脑组织的MAM样品中鉴定了1239种可定量蛋白,其中有144种蛋白在糖尿病中显著改变。有报道<sup>[25]</sup>使用邻近标记与质谱技术结合的方法研究MAM,发现了一种含有pdz结构域的线粒体蛋白SYNJ2BP,该蛋白能够与核糖体结合蛋白RRBP1相互作用,且其过表达会显著增加线粒体与粗面内质网的接触。Kwak等<sup>[26]</sup>利用特殊的邻近标记方法Contact-ID对MAM定位的蛋白质进行生物素化,再通过质谱鉴定生物素化位点,

最终鉴定了 115 个具有不同功能的 MAM 蛋白, 其中包含新的 MAM 蛋白 FKBP8。

目前, 还未见利用蛋白质组学技术系统鉴定酵母细胞中 MAM 蛋白的报道。为了挖掘酵母细胞中潜在的 MAM 蛋白, 本研究拟利用蛋白质组学技术对不同营养条件下培养的酿酒酵母细胞的 MAM 蛋白进行分析, 希望为发现酵母中新的 MAM 蛋白以及后续的功能研究提供有力的数据支持和理论基础。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与装置

Exactive™ Plus Orbitrap 高分辨液相色谱-质谱联用仪、细胞均质器: 美国 Thermo Fisher 公司产品; 高速冷冻离心机: 德国 Eppendorf 公司产品; 离心浓缩干燥仪: 美国 Labconco 公司产品; 超高速制备离心机: 美国贝克曼公司产品; 多功能酶标仪: 美国 BioTek 公司产品。

### 1.2 主要材料与试剂

BCA 定量试剂盒: 天根生化科技(北京)有限公司产品; 蛋白酶抑制剂: 瑞士 Roche 公司产品; Percoll、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺(iodacetamide, IAM)、乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(ethylenebis(oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid, EGTA)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid, HEPES): 美国 Sigma 公司产品; 胰蛋白酶: 美国 Promega 公司产品; 酵母粉、细菌学蛋白胨: 美国 OXOID 公司产品; 山梨醇: 德国 BioFroxx 公司产品; 酵母细胞溶壁酶(Zymolyase-20T): 日本 Nacalai Tesque 公司产品; 葡萄糖(glucose, Gluc)、蔗糖、甘露醇、碳酸氢铵、氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠等: 中国国药产品; 甲醇、乙腈、甲酸水溶液等试剂: 美国 Thermo Fisher 公司产品。

酵母菌株酿酒酵母 W303-1A(MAT $\alpha$  leu2-3, 112 ura3-1, trp1-1, his3-1, 15 ade2-1): 武汉淼灵生物科技有限公司产品。

### 1.3 实验条件

**1.3.1 色谱条件** 使用自制的 C18 色谱柱(15 cm $\times$  75  $\mu$ m $\times$ 3  $\mu$ m, 100 Å)进行样品分离; 采用流速 0.3  $\mu$ L/min 进行酶解肽段分离; 流动相: A 为 0.1%甲酸-水溶液, B 为 0.1%甲酸-乙腈溶液; 梯度洗脱程序: 0~8 min(3%~5%B), 8~68 min(5%~25%B), 68~73 min(25%B), 73~100 min

(25%~40%B), 100~109 min(40%~100%B), 109~114 min(100%B), 114~118 min(100%~3%B), 118~120 min(3%B)。

**1.3.2 质谱条件** 采用依赖性数据采集模式, 质量扫描范围  $m/z$  350~2 000; 一级质谱分辨率为 70 000, 一级自动增益控制(automatic gain control, AGC)为  $3\times 10^6$ ; 选取前 20 的离子进行二级质谱检测, 分离窗口  $m/z$  1.8, 动态排除时间 50 s, 二级质谱分辨率 17 500, AGC 为  $5\times 10^4$ 。

**1.3.3 搜库条件** 使用 Proteome Discoverer V2.1 软件对质谱 RAW 文件进行分析, 所使用的 Fasta 文件包含从 UniProt 下载的酵母蛋白组序列, 具体检索参数设置如下: 酶切方式为胰蛋白酶酶切(trypsin), 允许最多 2 个漏切位点, 可变修饰为蛋氨酸氧化和蛋白质 N 端乙酰化, 固定修饰为半胱氨酸酰胺化, 最大母离子质量偏差设置为  $1\times 10^{-5}$ , 最大碎裂片段质量偏差设置为 0.02 u, 肽段和蛋白水平错误发现率(false discovery rate, FDR)设置为 1%。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 去除细胞壁** 培养不同葡萄糖浓度(0.2%、2%、8%)的酵母菌至 OD<sub>600</sub> 在 0.4~0.5 范围内, 以 5 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 用 10 mmol/L DTT 还原缓冲液(2 mL/g)重悬细胞, 30 °C 孵育 30 min, 然后以 5 000 r/min 离心 5 min, 室温收集细胞; 再用 Zymolyase 缓冲液(7 mL/g)重悬细胞, 并加入 Zymolyase-20T(每 g 细胞加入 5 mg Zymolyase-20T), 30 °C 孵育 30 min 后, 以 5 000 r/min 离心 5 min, 室温收集细胞, 用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤 2 次, 再以 5 000 r/min 离心 5 min, 收集酵母细胞。

**1.4.2 MAM 提取** 将上述酵母细胞重悬在蔗糖均质液(0.25 mol/L 蔗糖, 10 mmol/L HEPES, pH 7.4), 用细胞均质器均质 40~45 次, 在 4 °C 下以 2 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 重复 4~7 次; 合并上清液, 在 4 °C 下以 10 500 r/min 离心 10 min, 重复 3 次, 收集沉淀。用 600  $\mu$ L 冰甘露醇缓冲液 A(0.25 mol/L 甘露醇, 0.5 mmol/L EGTA, 0.5 mmol/L HEPES, pH 7.4)重悬沉淀, 均质 30~35 次; 取 9.5 mL 30% Percoll 悬浮液分配到超速离心管中, 将上述均质化样品置于 30% Percoll 悬浮液顶部, 以 23 600 r/min 离心 65 min。超速离心后, 使用 20-G 针从 Percoll 梯度中提取带状 MAM, 每 200  $\mu$ L 样品加入 1 mL PBS, 在

4 ℃ 下以 8 200 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 再以 33 000 r/min 离心 30 min。在超速离心管底部的密集 Percoll 颗粒上方形成了松散的 MAM 颗粒, 即为纯的 MAM 蛋白。随后, 使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。

**1.4.3 蛋白酶解除盐** 取 100 μg 上述 MAM 蛋白质溶液, 加入 100 mmol/L DTT, 使 DTT 的终浓度为 10 mmol/L, 在 37 ℃ 孵育 30 min。然后加入 100 mmol/L IAM, 使 IAM 的终浓度为 15 mmol/L, 在 37 ℃ 避光反应 30 min。随后加入 2 μg 胰蛋白酶, 37 ℃ 摇床上过夜酶解, 加入甲酸(终浓度 1%)终止酶解反应后进行 Stage-Tip 除盐。

### 1.5 数据处理与分析

本实验对每个条件下的样品进行 2 次生物学重复, 对 2 次生物学重复样品分别进行 2 次和 3 次技术重复。根据蛋白质定位及功能注释信息对鉴定的蛋白进行筛选, 去除线粒体内膜、线粒体基质、细胞核、胞外分泌等蛋白。采用质谱峰面积进行非标记定量, 利用对照组比实验组的定量数据进行蛋白质差异表达分析, 选择在每组样品中鉴定到不少于 3 次的蛋白进行 *t* 检验, 其中,  $P \leq 0.05$  且倍数变化  $\geq 2$  或  $\leq 0.5$  分别为上调和下调的差异蛋白。

使用在线网站 Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) ([https://](https://david-d.ncifcrf.gov/)

[david-d.ncifcrf.gov/](https://david-d.ncifcrf.gov/)) 对蛋白进行 GO (Gene Ontology) 富集和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 代谢通路分析, 取前 10 条目绘制图形。使用在线网站 STING (<https://cn.string-db.org/>) 对差异蛋白进行互作网络预测分析, 选择 STING 数据库中相互作用分数大于 0.7 且最大交互度为 30 的蛋白质相互作用。使用 Cytoscape 和 Adobe Illustrator 软件对蛋白质互作网络作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 蛋白质鉴定及数据质量评估

由于目前未见酵母 MAM 蛋白质组学的研究报道, 本课题组利用哺乳动物细胞 MAM 组分分离实验中常用的 Percoll 梯度差速离心技术对酵母 MAM 组分进行分离和蛋白质提取, 示于图 1。在密度梯度中得到了预期的纯白色 MAM 组分, 随后对该组分中的蛋白质进行酶解和质谱鉴定。

通过对不同营养条件下酵母的 MAM 组分进行质谱分析, 共鉴定到 3 432 个蛋白, 其中约 50% 蛋白质在 3 种条件下均被鉴定到, 示于图 2a。细胞器定位分析表明, 这些蛋白主要位于线粒体、内质网和细胞质, 示于图 2b, 同时也发现了部分蛋白质位于高尔基体、质膜、液泡和其他明显不相关的亚细胞区室。该结果同哺乳动物

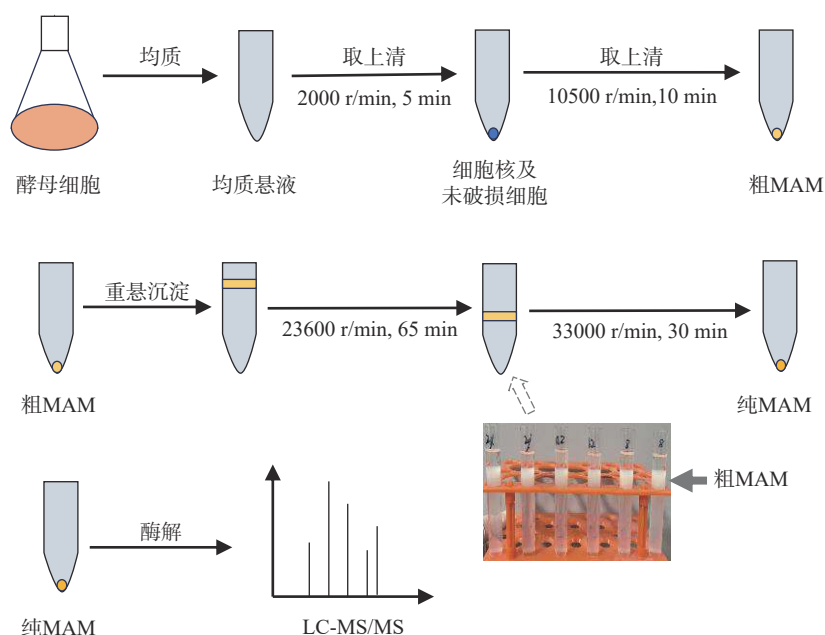


图 1 MAM 蛋白提取及鉴定流程

Fig. 1 Workflow of MAM proteins extraction and identification

样品的 MAM 与多个细胞区室相互作用的结果<sup>[27-28]</sup>一致。同时,本课题组还鉴定到已知的酵

母 MAM 蛋白,例如经典的 ERMES 复合物的组成成分,证明了本研究的数据可靠,结果列于表 1。

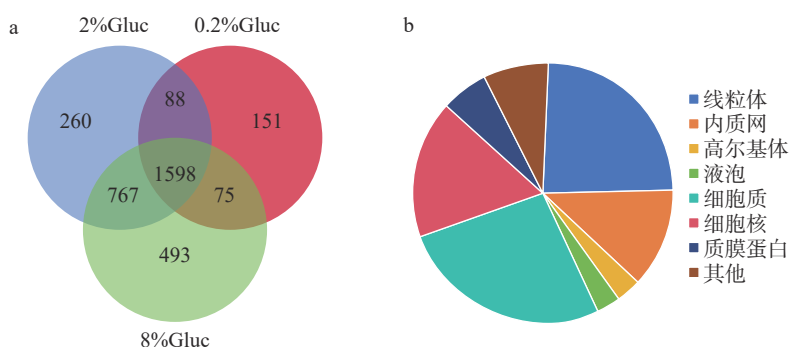


图 2 不同营养条件下鉴定到的 MAM 蛋白的数量和重合度(a)以及定位分布(b)

Fig. 2 Number, overlap (a) and subcellular location distribution (b) of identified MAM proteins under different nutritional conditions

表 1 不同营养条件下鉴定到的已知 MAM 蛋白

Table 1 Known MAM proteins identified under different nutritional conditions

蛋白名称 Protein name	基因名称 Gene name	肽段匹配到二级质谱图的数目 Peptide-spectrum matches, PSMs		
		2%葡萄糖 2%Gluc	0.2%葡萄糖 0.2%Gluc	8%葡萄糖 8%Gluc
Mitochondrial import receptor subunit TOM70	TOM70	16	22	11
Mitochondrial distribution and morphology protein 10	MDM10	0	1	1
ER membrane protein complex subunit 1	EMC1	33	35	32
ER membrane protein complex subunit 3	EMC3	4	10	6
Protein TOM71	TOM71	8	4	8
Mitochondrial Rho GTPase 1	GEM1	3	3	4
ER membrane protein complex subunit 5	EMC5	6	6	6
Maintenance of mitochondrial morphology protein 1	MMM1	5	7	7
ER membrane protein complex subunit 2	EMC2	15	22	14
ER membrane protein complex subunit 4	EMC4	8	11	7
Mitochondrial distribution and morphology protein 34	MDM34	0	0	1
Membrane-anchored lipid-binding protein LAM6	LAM6	0	1	0
Mitochondrial distribution and morphology protein 12	MDM12	1	1	0

## 2.2 MAM 蛋白的进一步筛选及功能分析

为了得到高可信度的 MAM 蛋白质,本课题组根据已知定位信息对数据进行筛选,最终得到了 1 486 个 MAM 组分蛋白,在 2%、0.2%、8% 葡萄糖浓度下分别鉴定到 1 248、1 069、1 283 个蛋白,示于图 3a。KEGG 通路分析表明,这些蛋白主要参与了糖的生物合成、脂肪酸代谢和类固醇的生物合成、内质网的蛋白质加工、氨基酸的生物合成等代谢通路,示于图 3b。这些代谢通路与哺乳动物细胞中 MAM 蛋白的功能研究结

果一致<sup>[29]</sup>。通过对这些蛋白进行功能富集分析发现,它们主要参与蛋白质合成与转运、糖代谢和脂质代谢等生物学过程;定位于内质网、线粒体和高尔基体等细胞器;具有转移酶活性、氧化还原酶活性、质子转运 ATP 酶活性以及蛋白质和脂质结合等分子功能,示于图 3c。

众所周知,在应对营养胁迫时,线粒体在低浓度葡萄糖下发生融合,而在高浓度葡萄糖下发生裂变<sup>[30]</sup>。在此过程中,MAM 蛋白发挥着重要的调节作用<sup>[31]</sup>。本实验鉴定到了与线粒体分裂

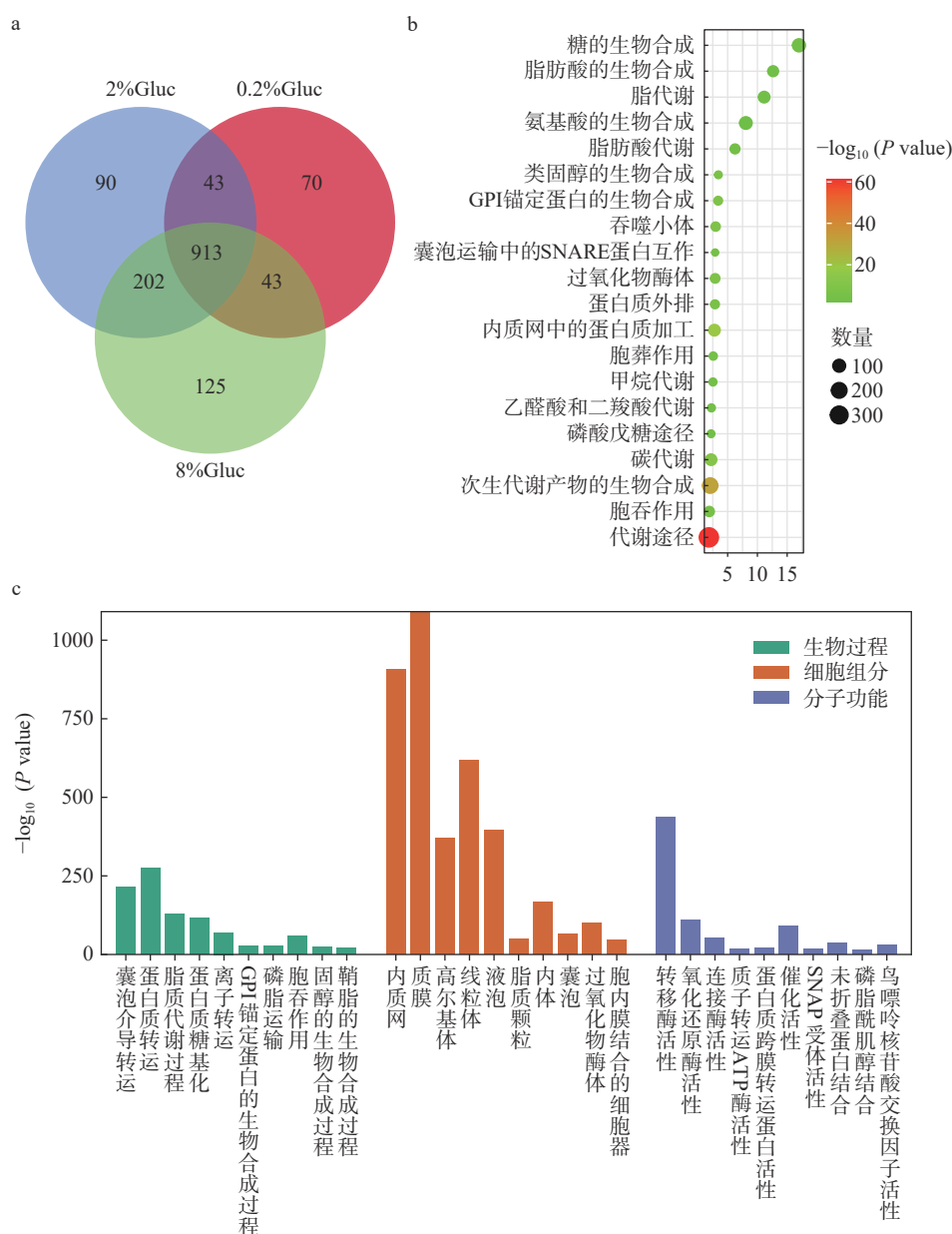


图 3 不同条件下鉴定的 MAM 蛋白(a)及其 KEGG 通路富集(b)和功能富集(c)  
**Fig. 3 MAM proteins identified under different conditions (a), and KEGG pathway (b) and functional enrichment (c) based on these proteins**

融合相关的蛋白质 CAF4、FIS1、DNM1、FZO1 和 UGO1。其中, FZO1 和 DNM1 为线粒体外膜蛋白, 介导线粒体融合和裂变, 控制线粒体形态<sup>[32]</sup>; FIS1 调节线粒体小管中 DNM1 组装成点状结构, 促进线粒体膜收缩和(或)分裂<sup>[33]</sup>; 线粒体转运蛋白 UGO1 通过连接线粒体融合蛋白 FZO1 和 MGM1, 在线粒体融合过程中协调内膜和外膜的融合<sup>[34]</sup>。

除上述对线粒体结构具有调节作用的蛋白质外, 还鉴定到与脂质代谢相关的蛋白质。例如, 内质网蛋白 CSF1 和 FMP27 被发现位于内质

网和线粒体中间, 发挥着脂质转运的功能<sup>[35]</sup>; 内质网蛋白 Mlg1(YDR018C)是一种酵母酰基转移酶, 位于 MAM 中, 参与磷脂的从头合成和重塑<sup>[36]</sup>。此外, 还发现了部分未被证实的 MAM 蛋白, 它们与哺乳动物细胞中的 MAM 蛋白具有相同的功能, 例如囊泡转运(SSO2、GOS1、VAM6 等)、离子转运(RSN1、YVC1、ATP18 等)、固醇合成(ERG1、ERG2、ERG3 等)和自噬(ATG39、ATG15、ATG22 等)。由此推测, 在酵母中, MAM 蛋白可能也参与调节以上生理过程。

### 2.3 差异表达蛋白分析

2%葡萄糖是酵母的正常培养条件,而0.2%和8%葡萄糖分别代表低葡萄糖胁迫和过营养胁迫,将这2种胁迫条件与2%葡萄糖的正常培养条件进行比较发现,在营养饥饿条件下共有176个差异蛋白,其中上调蛋白39个,下调蛋白137个,示于图4a;而在过营养胁迫条件下共有158个差异蛋白,其中上调蛋白155个,下调蛋白3个,示于图4b。

在饥饿胁迫下,参与质子传递ATPase活性的蛋白质VMA2、VMA3、VOA1、VMA4、VMA6、VMA1和VMA13均表现为下调表达。 $v$ -ATPase活性下降会影响ATP水解和能量供应。 $v$ -ATPase失活可能会导致能量供应不足,进而影响线粒体的能量代谢和功能,同时也会导致内质网中钙离子浓度异常,影响线粒体对钙离子的摄取。钙离子是线粒体代谢和功能的重要调节因子,其失调可能导致线粒体功能障碍<sup>[37]</sup>。而在过营养胁迫下,内质网中未折叠或错误折叠的蛋白质增多,启动了内质网应激反应<sup>[38]</sup>。内质网蛋白(SEC62、SEC61、SIL27、SEC63、SEC22和SEC72)均表现为上调表达,推测其可能通过增强蛋白质的转运和折叠效率,减少错误折叠蛋白的积累,减弱内质网应激<sup>[39]</sup>。

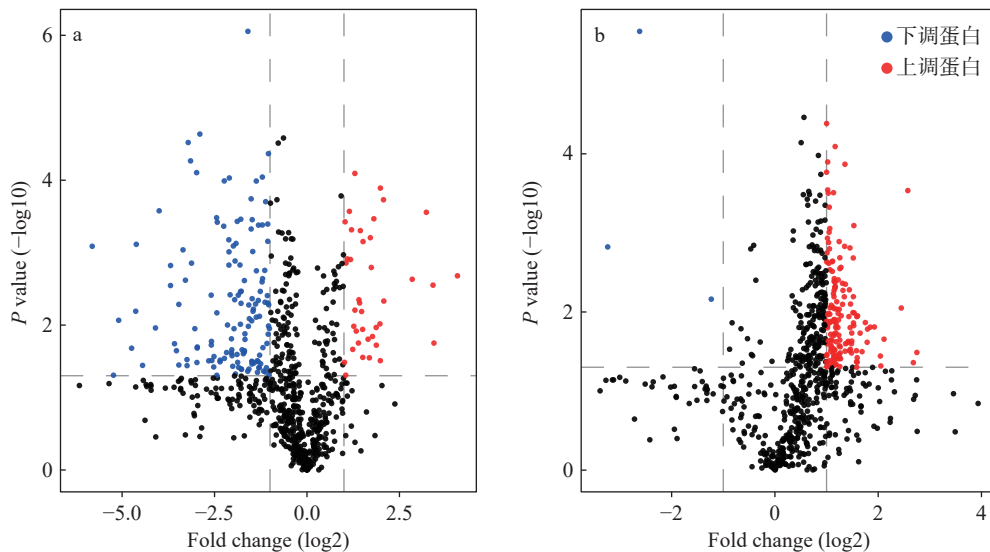
高亲和力葡萄糖转运蛋白HXT6和HXT7在饥饿条件下为上调表达,过营养条件下为下调

表达,这与文献<sup>[40]</sup>报道一致。该蛋白定位在线粒体膜上,参与葡萄糖的摄取,这些转运蛋白可能影响线粒体的能量代谢过程,改变线粒体的代谢状态。

与固醇生物合成途径相关的蛋白质ERG5、ERG9、ERG24和ERG26在饥饿和过营养胁迫条件下均为上调表达。有研究<sup>[41-42]</sup>表明,MAM可能作为哺乳动物和酵母细胞中固醇输入的平台。哺乳动物类固醇生成急性调节蛋白STARD1,以PKA依赖性方式将游离内质网衍生的胆固醇从细胞质运送到线粒体<sup>[43]</sup>。在MAM的线粒体面上,固醇经过阴离子通道蛋白VDAC进入线粒体<sup>[44]</sup>,并分布到细胞器内<sup>[45]</sup>。在酵母中,含有StAR结构域的蛋白质Lam6p/Ltc1p定位于MAM<sup>[46]</sup>,并在MAM区域内将固醇转移到线粒体<sup>[47]</sup>。因此推测,ERG5等蛋白可能通过MAM区域调控酵母细胞的固醇代谢而确保细胞的正常功能。

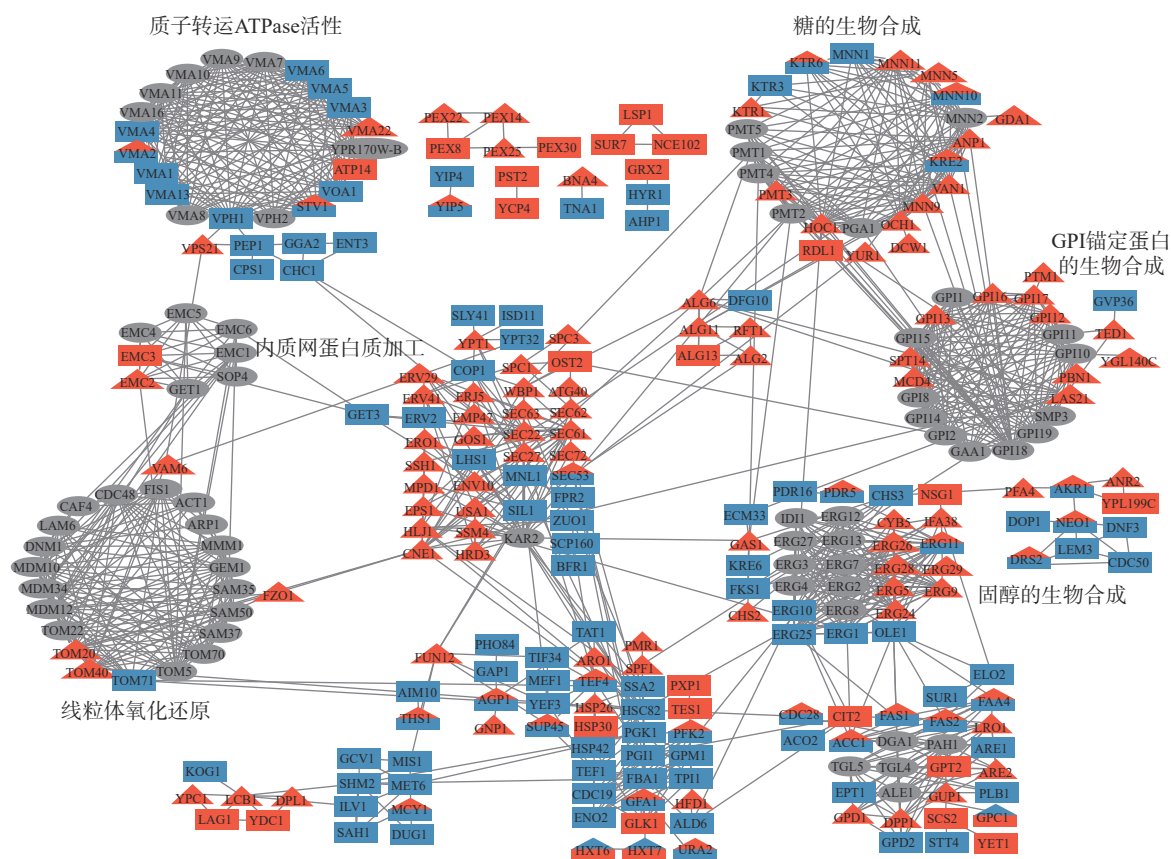
### 2.4 蛋白质互作网络分析

蛋白质往往不是独立的,而是通过与其他蛋白质相互作用来行使功能。通过蛋白质与蛋白质之间的相互作用信息,可以更清晰地了解其分子机理和调控过程。为了进一步了解差异表达的MAM蛋白如何参与胁迫响应,本实验构建了蛋白质互作网络,示于图5。结果表明,这些蛋白质形成了多个互作簇,且主要参与糖的生物合



注: Fold change < 2,  $P < 0.05$

图4 0.2%(a)和8%(b)葡萄糖培养条件下的MAM蛋白与2%葡萄糖培养条件下的MAM蛋白的比较结果  
Fig. 4 Comparison results of MAM proteins under 0.2% (a) and 8% (b) glucose culture samples with MAM proteins under 2% glucose culture samples



注:长方形表示饥饿条件;三角形表示过营养条件;红色表示上调蛋白;蓝色表示下调蛋白;灰色椭圆表示未鉴定到的互作蛋白

图5 差异表达 MAM 蛋白的互作网络

Fig. 5 Interaction network of differentially expressed MAM proteins

成、质子转运 ATPase 活性、GPI 锚定蛋白的生物合成、固醇的生物合成、内质网蛋白质加工和线粒体氧化还原等过程。

内质网蛋白 MCD4 在饥饿条件下为上调表达,且能与 GPI12、GPI13、GPI16 和 GPI17 发生相互作用,这些蛋白质在此前未被报道为酵母 MAM 蛋白质。糖基磷脂酰肌醇 (glycosylphosphatidylinositol, GPI) 是一种存在于所有真核生物表面蛋白上的糖脂膜锚点,在内质网膜中合成,每个 GPI 锚点需要 3 个磷酸乙醇胺 (ethanolamine phosphate, P-Etn) 分子,这些分子来源于磷脂酰乙醇胺。MCD4 是将 P-Etn 添加到新生 GPI 锚点上的酶,共同参与 GPI 锚定途径,对于细胞膜蛋白质的锚定和信号转导功能非常重要<sup>[48]</sup>。CSF1 是含有 GPI 锚定的糖脂膜蛋白,定位于 MAM 上,能够与 MCD4 相互作用并将磷脂酰乙醇胺转运到 MCD4 上以支持 GPI 锚点的生物合成<sup>[35]</sup>。由此推测, MCD4 及其互作蛋白能够参与 MAM 信号传导和膜融合过程。

在过营养条件下,内质网蛋白 CNE1 上调表达,该蛋白质也是本研究新鉴定到的酵母 MAM 蛋白。CNE1 在哺乳动物中的同源蛋白 Calnexin 也是内质网钙连蛋白。Calnexin 经过棕榈酰化后在内质网与线粒体连接的膜区域显著富集,参与内质网钙信号调控和 MAM 区域的蛋白质折叠及质量控制,确保新合成的糖蛋白正确折叠,防止蛋白质错误折叠引发的应激反应<sup>[49-50]</sup>。研究<sup>[51]</sup>表明, CNE1 能与 ERO1 相互作用。ERO1 是一种内质网氧化还原酶,参与蛋白质二硫键的形成,对蛋白质的正确折叠至关重要<sup>[52]</sup>,而在过营养条件会导致内质网中未折叠或错误折叠的蛋白质增多<sup>[38]</sup>。因此推测,在酵母中, CNE1 与 ERO1 在 MAM 区域共同参与蛋白质折叠以响应环境压力。

### 3 结论

本文从蛋白质组学的角度系统地分析了酿酒酵母细胞在不同营养条件下的 MAM 蛋白组分。除鉴定到目前已知的与酵母中线粒体相关



的内质网膜区域蛋白质外,还得到了尚未报道的潜在 MAM 蛋白。在不同营养条件下, MAM 中存在显著的差异蛋白表达,这些蛋白主要涉及能量代谢、氧化还原反应、蛋白质折叠和钙信号传导等功能。在饥饿和过营养胁迫下,内质网和线粒体的相互作用对细胞生理过程起着重要的调节作用。通过深入研究这些差异蛋白及其功能,可以更好地理解 MAM 在细胞内的复杂调控机制,为进一步探索 MAM 相关的生物学功能及其在细胞适应不同环境胁迫中的作用提供了线索。

#### 参考文献:

- [1] COPELAND D E, DALTON A J. An association between mitochondria and the endoplasmic reticulum in cells of the pseudobranch gland of a teleost[J]. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1959, 5(3): 393-396.
- [2] CAO Y, CHEN Z, HU J, FENG J, ZHU Z, FAN Y, LIN Q, DING G. Mfn2 regulates high glucose-induced MAMs dysfunction and apoptosis in podocytes via PERK pathway[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 769-213.
- [3] HORNER S M, LIU H M, PARK H S, BRILEY J, GALE M. Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(35): 14 590-14 595.
- [4] CSORDÁS G, RENKEN C, VÁRNAI P, WALTER L, WEAVER D, BUTTLE K F, BALLA T, MANNELLA C A, HAJNÓCZKY G. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2006, 174(7): 915-921.
- [5] VANCE J E. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(13): 7 248-7 256.
- [6] RIZZUTO R, PINTON P, CARRINGTON W, FAY F S, FOGARTY K E, LIFSHITZ L M, TUFT R A, POZZAN T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial  $Ca^{2+}$  responses[J]. *Science*, 1998, 280(5 370): 1 763-1 766.
- [7] LUAN Y, LUAN Y, YUAN R X, FENG Q, CHEN X, YANG Y. Structure and function of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAMs) and their role in cardiovascular diseases[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 2 021: 4 578 809.
- [8] RESENDE R, FERNANDES T, PEREIRA A C, MARQUES A P, PEREIRA C F. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts modulate reactive oxygen species-mediated signaling and oxidative stress in brain disorders: the key role of sigma-1 receptor[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2022, 37(10/11/12): 758-780.
- [9] MORCIANO G, MARCHI S, MORGANTI C, SBANO L, BITTREMIEUX M, KERKHOF S, CORRICELLI M, DANESE A, KARKUCINSKA-WIECKOWSKA A, WIECKOWSKI M R, BULTYNCK G, GIORGI C, PINTON P. Role of mitochondria-associated ER membranes in calcium regulation in cancer-specific settings[J]. *Neoplasia*, 2018, 20(5): 510-523.
- [10] LEE S, MIN K T. The interface between ER and mitochondria: molecular compositions and functions[J]. *Molecules and Cells*, 2018, 41(12): 1 000-1 007.
- [11] ZHANG Y, YAO J, ZHANG M, WANG Y, SHI X. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAMs): possible therapeutic targets in heart failure[J]. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2023, 10: 1 083 935.
- [12] RIZZUTO R, de STEFANI D, RAFFAELLO A, MAMMUCARI C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, 13(9): 566-578.
- [13] SUN D, CHEN X, GU G, WANG J, ZHANG J. Potential roles of mitochondria-associated ER membranes (MAMs) in traumatic brain injury[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2017, 37(8): 1 349-1 357.
- [14] GARCÍA-PÉREZ C, HAJNÓCZKY G, CSORDÁS G. Physical coupling supports the local  $Ca^{2+}$  transfer between sarcoplasmic reticulum subdomains and the mitochondria in heart muscle[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(47): 32 771-32 780.
- [15] RIZZUTO R, BRINI M, MURGIA M, POZZAN T. Microdomains with high  $Ca^{2+}$  close to IP<sub>3</sub>-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria[J]. *Science*, 1993, 262(5 134): 744-747.
- [16] CHEN H, DETMER S A, EWALD A J, GRIFFIN E E, FRASER S E, CHAN D C. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2003, 160(2): 189-200.
- [17] WOZNY M R, di LUCA A, MORADO D R, PICCO A, KHADDAJ R, CAMPOMANES P, IVANOVIĆ L, HOFFMANN P C, MILLER E A, VANNI S, KUKULSKI W. *In situ* architecture of the ER-mitochondria encounter structure[J]. *Nature*, 2023, 618: 188-192.

- [18] KORNMAN B, CURRIE E, COLLINS S R, SCHULDINER M, NUNNARI J, WEISSMAN J S, WALTER P. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen[J]. *Science*, 2009, 325(5 939): 477-481.
- [19] CSORDÁS G, VÁRNAI P, GOLENÁR T, ROY S, PURKINS G, SCHNEIDER T G, BALLA T, HAJNÓCZKY G. Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface[J]. *Molecular Cell*, 2010, 39(1): 121-132.
- [20] VOSS C, LAHIRI S, YOUNG B P, LOEWEN C J, PRINZ W A. ER-shaping proteins facilitate lipid exchange between the ER and mitochondria in *S. cerevisiae*[J]. *Journal of Cell Science*, 2012, 125(20): 4 791-4 799.
- [21] KORNMAN B, OSMAN C, WALTER P. The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(34): 14 151-14 156.
- [22] RASUL F, ZHENG F, DONG F, HE J, LIU L, LIU W, CHEEMA J Y, WEI W, FU C. Emr1 regulates the number of foci of the endoplasmic reticulum-mitochondria encounter structure complex[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 521.
- [23] HERRERA-CRUZ M S, SIMMEN T. Of yeast, mice and men: MAMs come in two flavors[J]. *Biology Direct*, 2017, 12(1): 3.
- [24] MA J, SHEN S, WANG J, HE Z, POON A, LI J, QU J, ZHANG S. Comparative proteomic analysis of the mitochondria-associated ER membrane (MAM) in a long-term type 2 diabetic rodent model[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 2 062.
- [25] HUNG V, LAM S S, UDESHI N D, SVINKINA T, GUZMAN G, MOOTHA V K, CARR S A, TING A Y. Proteomic mapping of cytosol-facing outer mitochondrial and ER membranes in living human cells by proximity biotinylation[J]. *eLife*, 2017, 6: e24 463.
- [26] KWAK C, SHIN S, PARK J S, JUNG M, NHUNG T T M, KANG M G, LEE C, KWON T H, PARK S K, MUN J Y, KIM J S, RHEE H W. Contact-ID, a tool for profiling organelle contact sites, reveals regulatory proteins of mitochondrial-associated membrane formation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(22): 12 109-12 120.
- [27] WANG X, WEN Y, DONG J, CAO C, YUAN S. Systematic in-depth proteomic analysis of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes in mouse and human testes[J]. *Proteomics*, 2018, 18(14): e1700478.
- [28] ZHANG A, WILLIAMSON C D, WONG D S, BULLOUGH M D, BROWN K J, HATHOUT Y, COLBERG-POLEY A M. Quantitative proteomic analyses of human cytomegalovirus-induced restructuring of endoplasmic reticulum-mitochondrial contacts at late times of infection[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011, 10(10): M111.009 936.
- [29] LI Z, CAO Y, PEI H, MA L, YANG Y, LI H. The contribution of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAMs) dysfunction in Alzheimer's disease and the potential countermeasure[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2023, 17: 1 158 204.
- [30] LACKNER L L. Shaping the dynamic mitochondrial network[J]. *BMC Biology*, 2014, 12: 35.
- [31] LEWIS S C, UCHIYAMA L F, NUNNARI J. ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells[J]. *Science*, 2016, 353(6 296): aaf5549.
- [32] SESAKI H, JENSEN R E. Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1999, 147(4): 699-706.
- [33] TIEU Q, NUNNARI J. Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2000, 151(2): 353-366.
- [34] SESAKI H, JENSEN R E. UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2001, 152(6): 1 123-1 134.
- [35] TOULMAY A, WHITTLE F B, YANG J, BAI X, DIARRA J, BANERJEE S, LEVINE T P, GOLDEN A, PRINZ W A. Vps13-like proteins provide phosphatidylethanolamine for GPI anchor synthesis in the ER[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2022, 221(3): e202111095.
- [36] LAQUEL P, AYCIRIEX S, DOIGNON F, CAMOUGRAND N, FOUGÈRE L, ROCHER C, WATTELET-BOYER V, BESSOULE J J, TESTET E. Mlg1, a yeast acyltransferase located in ER membranes associated with mitochondria (MAMs), is involved in *de novo* synthesis and remodelling of phospholipids[J]. *The FEBS Journal*, 2024, 291(12): 2 683-2 702.
- [37] de RIDDER I, KERKHOFS M, LEMOS F O, LONCKE J, BULTYNCK G, PARYS J B. The ER-mitochondria interface, where  $Ca^{2+}$  and cell death meet[J]. *Cell Calcium*, 2023, 112: 102 743.

- [38] TRAN D M, ISHIWATA-KIMATA Y, MAI T C, KUBO M, KIMATA Y. The unfolded protein response alongside the diauxic shift of yeast cells and its involvement in mitochondria enlargement[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 12 780.
- [39] JUNG S J, KIM H. Emerging view on the molecular functions of Sec62 and Sec63 in protein translocation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(23): 12 757.
- [40] BUZIOL S, WARTH L, MAGARIO I, FREUND A, SIEMANN-HERZBERG M, REUSS M. Dynamic response of the expression of hxt1, hxt5 and hxt7 transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae* to perturbations in the extracellular glucose concentration[J]. *Journal of Biotechnology*, 2008, 134(3/4): 203-210.
- [41] LUCKEN-ARDJOMANDE S, MONTESSUIT S, MARTINOU J C. Bax activation and stress-induced apoptosis delayed by the accumulation of cholesterol in mitochondrial membranes[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2008, 15(3): 484-493.
- [42] ALTMANN K, WESTERMANN B. Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(11): 5 410-5 417.
- [43] MILLER W L. Steroid hormone synthesis in mitochondria[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2013, 379(1/2): 62-73.
- [44] BOSE H S, LINGAPPA V R, MILLER W L. Rapid regulation of steroidogenesis by mitochondrial protein import[J]. *Nature*, 2002, 417: 87-91.
- [45] CAMPBELL A M, CHAN S H P. The voltage dependent anion channel affects mitochondrial cholesterol distribution and function[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 466(2): 203-210.
- [46] GATTA A T, WONG L H, SERE Y Y, CALDERÓN-NOREÑA D M, COCKCROFT S, MENON A K, LEVINE T P. A new family of StART domain proteins at membrane contact sites has a role in ER-PM sterol transport[J]. *eLife*, 2015, 4: e07253.
- [47] MURLEY A, SARSAM R D, TOULMAY A, YAMADA J, PRINZ W A, NUNNARI J. Ltc1 is an ER-localized sterol transporter and a component of ER-mitochondria and ER-vacuole contacts[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2015, 209(4): 539-548.
- [48] GUO Z. Glycosphingolipid and glycosylphosphatidylinositol affect each other in and on the cell[J]. *Chem-biochem: a European Journal of Chemical Biology*, 2023, 24(13): e202200761.
- [49] RATURI A, SIMMEN T. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion Tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM)[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1833(1): 213-224.
- [50] LYNES E M, BUI M, YAP M C, BENSON M D, SCHNEIDER B, ELLGAARD L, BERTHIAUME L G, SIMMEN T. Palmitoylated TMX and calnexin target to the mitochondria-associated membrane[J]. *The EMBO Journal*, 2012, 31(2): 457-470.
- [51] COSTANZO M, VanderSLUIS B, KOCH E N, BARYSHNIKOVA A, PONS C, TAN G, WANG W, USAJ M, HANCHARD J, LEE S D, PELECHANO V, STYLES E B, BILLMANN M, van LEEUWEN J, van DYK N, LIN Z Y, KUZMIN E, NELSON J, PIOTROWSKI J S, SRIKUMAR T, BAHR S, CHEN Y, DESHPANDE R, KURAT C F, LI S C, LI Z, USAJ M, OKADA H, PASCOE N, LUIS B J S, SHARIFPOOR S, SHUTERIQI E, SIMPKINS S W, SNIDER J, SURESH H G, TAN Y, ZHU H, MALOD-DOGNIN N, JANJIC V, PRZULJ N, TROYANSKAYA O G, STAGLJAR I, XIA T, OHYA Y, GINGRAS A C, RAUGHT B, BOUTROS M, STEINMETZ L M, MOORE C L, ROSEBROCK A P, CAUDY A A, MYERS C L, ANDREWS B, BOONE C. A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function[J]. *Science*, 2016, 353(6 306): aaf1420.
- [52] BASSOT A, CHEN J, TAKAHASHI-YAMASHIRO K, YAP M C, GIBHARDT C S, LE G N T, HARIO S, NASU Y, MOORE J, GUTIÉRREZ T, MINA L, MAST H, MOSES A, BHAT R, BALLANYI K, LEMIEUX H, SITIA R, ZITO E, BOGESKI I, CAMPBELL R E, SIMMEN T. The endoplasmic reticulum kinase PERK interacts with the oxidoreductase ERO1 to metabolically adapt mitochondria[J]. *Cell Reports*, 2023, 42(1): 111 899.

(收稿日期: 2024-07-19; 修回日期: 2024-08-22)