

# 酵母细胞对高渗环境的适应与胞内甘油累积

余秉琦 诸葛健

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

**摘要** 甘油是包括酿酒酵母在内的许多种酵母细胞中的主要相容性溶质。为适应在高渗环境下的生存,酵母细胞将在胞内累积甘油。胞内甘油累积的增加可由甘油合成的增强,甘油利用的减弱,细胞膜通透性下降导致的胞内甘油流失的减少以及从环境中吸取更多的甘油而产生。本文综述了酵母细胞对环境渗透压变化的信号传导,高渗诱导的基因表达,环境渗透压升高时酵母细胞内甘油的累积以及甘油合成的限速步骤。

**关键词** 酵母 渗透压 甘油 酵母 HOG 途径

随着环境中水活度( $a_w$ )的下降,酵母细胞内的水分将流向环境,同时一些浓度过高则对细胞有害的溶质如  $N^+$  将进入细胞内,细胞质膜上的离子梯度将受到破坏,细胞的生存能力将下降。如果细胞脱水严重,细胞将死亡。为了在低水活度的环境中生存、恢复和生长,细胞将在分子水平上做出一系列复杂的应答<sup>[1]</sup>。

处于低水活度环境中的微生物细胞用于抵御胞内水分外流的通用机制是提高胞内一种或多种特殊溶质的累积。这些相容性溶质能在胞内以高浓度存在而不对胞内的酶产生抑制或失活作用<sup>[2]</sup>。一般而言,相容性溶质可分为三大类:离子、氨基酸和多羟基化合物。甘油则是酿酒酵母和多种其它酵母细胞中最主要的相容性溶质<sup>[3]</sup>。

一般而言,酵母细胞内甘油浓度的增加可通过以下四种方法实现:(1)合成代谢的增强;(2)由于细胞质膜的变化引起的胞内甘油输出的减弱;(3)降解代谢的减弱;(4)从环境中吸取甘油<sup>[4]</sup>。

由于甘油在酵母细胞渗透压调节中的重要作用,近年来甘油的合成代谢途径及甘油在胞内的累积机理受到越来越多的关注。与此同时,现代工具和手段在酵母遗传学和分子生物学中的应用使得大量有关酵母对高渗环境的应答以及甘油代谢的新信息不断涌现<sup>[5,6]</sup>。

## 1 酵母细胞对环境渗透压变化的信号传导

细胞具有感知环境渗透压变化的能力,并将信

号传递到细胞核,在基因表达水平引起一系列变化。在包括酵母细胞在内的许多真核细胞中,这一过程由促有丝分裂原激活蛋白激酶途径(MAPKs pathway)来完成。目前,已经详细鉴定的 MAPKs 途径有酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中的高渗甘油途径(HOG pathway)<sup>[7~9]</sup>。

当胞外渗透压升高时,Hog1p 的酪氨酸被迅速磷酸化,Hog1p 的最大磷酸化在胞外渗透压升高后 1min 内达到。已发现,渗透压诱导多个 HOG 途径靶基因的转录受特异的被称为胁迫应答元件(STREs)的启动子元件介导。Hog1p 可能激活一个类似于 STE12 的转录因子(STE12 为酵母侵袭性生长应答途径和假菌丝发育途径中信号的输出皆必需,是这两个途径中最为关键的转录活化因子),这一转录因子控制由高渗透压调节单位诱导的转录。在酿酒酵母中已发现有两个完全不同的跨膜蛋白 Sln1p 和 Sho1p 充当渗透压感应蛋白参与对渗透压胁迫的感应。已发现这两个蛋白皆与特异性渗透压应答信号传递途径 HOG 途径相互作用(图 1)<sup>[10~14]</sup>。

通过对渗透压调节缺失突变株的研究发现这一途径在酿酒酵母中存在。很显然,HOG 途径参与渗透压胁迫诱导的甘油合成过程:*hag1* 突变株在对渗透压胁迫的应答中细胞不能增加 *GPD1* mRNA 水平。在 *GPD1* 启动子中已鉴定出四个 STREs<sup>[15]</sup>。Gpp2p, Hxt1p(己糖转运蛋白), Glk1p(葡萄糖激酶), A1d6p(乙醛脱氢酶同工酶)和 Dak1p(二羟丙酮激酶)也显示部分受 HOG 途径的调节<sup>[16]</sup>。然而,与细胞质膜阻留甘油有关的 Fps1p

通道似乎不受 HOG 途径的控制。事实上, *hog1* 突变株可以在渗透压胁迫过程中增加其胞内甘油浓度, 增幅水平大约为野生型细胞的 40%。Fps1p 可能对细胞膜张力的改变发生应答, 在酿酒酵母中存在着这类膜通道。然而, 这些膜通道在胞外水活度降低细胞皱缩时转运阳离子和阴离子并可能允许离子流出。

此外, 酿酒酵母中存在一个 Pbs2p/Hog1p 非依赖性渗透压信号传递途径。缺失 Pbs2p 突变株继续保留较高的对 HOG 靶基因如 *GPD1* 的诱导能力。被认为包含于酿酒酵母渗透压胁迫应答其它的不同信号传递途径可能还有: RAS-cAMP 途径,  $Ca^{2+}$ /钙调蛋白/钙调神经磷酸酶以及 PKC 途径。PKC 途径参与低渗胁迫而非高渗胁迫的应答<sup>[17]</sup>。

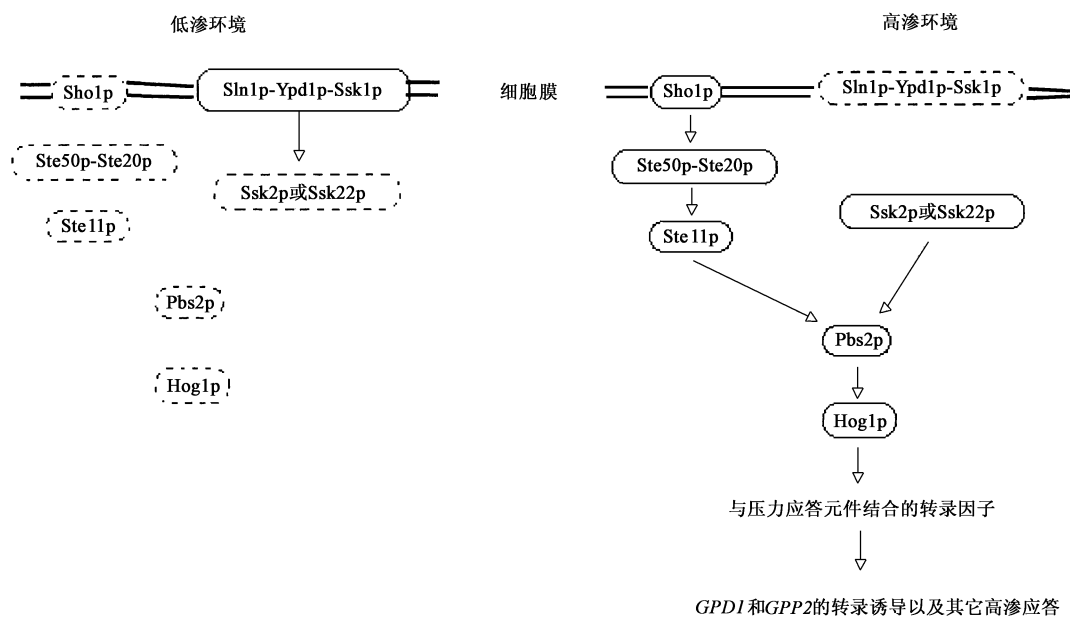


图 1 高渗环境对甘油合成途径关键酶基因的诱导

## 2 高渗诱导的基因表达

像在植物和哺乳动物细胞中一样, 在酵母细胞中相容性溶质的合成在基因表达水平受到调控。对渗透压的转录应答所涉及的基因约占酵母总基因的 5%<sup>[9]</sup>。

Martijn Rep (2000) 等对酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 在高渗环境中做出的应答进行了全基因组范围的分析研究。结果表明, 将细胞转入含 0.7mol/L NaCl 或 0.95mol/L 山梨醇的培养基中培养时, 多达 186 种基因的 mRNA 水平提高至少 3 倍。同时, 超过 100 种基因的 mRNA 水平下降至少 1.5 倍。许多被诱导的基因编码保护细胞免受各种伤害的蛋白质或编码甘油, 海藻糖和糖原代谢途径中的酶。一般编码核糖体蛋白或编码涉及到翻译的蛋白的基因的表达在环境渗透压升高时反而下降, 表明为应付环境变化细胞生长所出现的暂时性抑制。这个对酿酒酵母基因组范围的转录分析研究

目的在于对受高渗环境快速诱导的基因进行鉴别与分类。这些基因的被诱导依赖于 Hog1p 激酶, 转录因子 Hot1p 和 Msn2p/Msn4p。

已经证实编码甘油, 海藻糖和糖原代谢途径的酶的基因受渗透压和其它类型的环境的胁迫的诱导, 而甘油合成则为细胞在高渗环境中生存所必需。在酿酒酵母细胞中, 甘油合成酶 3-磷酸甘油脱氢酶和 3-磷酸甘油酯酶各有两个同工酶, 即 Gpd1p/Gpd2p 和 Gpp1p/Gpp2p。已知编码 Gpd1p 和 Gpp2p 的基因 *GPD1* 和 *GPP2* 受环境渗透压诱导。Martijn Rep 等的研究表明 *GPPI* 同样也受环境渗透压的诱导<sup>[18]</sup> (图 2)。这一结论与以往的研究结果不同。关于 *GPD2*, 它受缺氧环境条件的诱导以便通过合成甘油来调节细胞的氧化还原平衡<sup>[19]</sup>。

受渗透压变化所诱导的基因表达与受其它环境胁迫所诱导的基因表达之间具有重叠性, 例如, 当受到温和的热处理时, 酵母细胞中会出现低温保护现象; 而温和的盐处理可诱导出细胞的耐热性。

其原因至少有两个: (1) 不同的胁迫条件往往能在自然界同时存在。因此, 任何一种胁迫条件能引起广泛的应答, 但是, 并非其中所有应答都是必要的; (2) 一种胁迫干扰了细胞的正常功能从而间接诱导了其它类型的应答<sup>[20]</sup>。

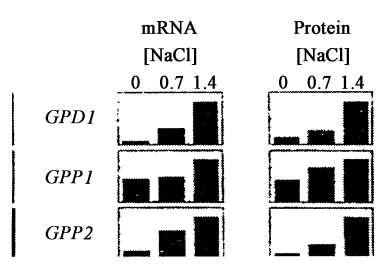


图 2 甘油合成途径关键酶基因的诱导表达<sup>[20]</sup>。

### 3 渗透压升高时酵母细胞内甘油的累积

当处于高渗环境中时, 大多数种类的酵母细胞在细胞内累积相容性溶质甘油以利于调节细胞内外渗透压的平衡。胞内甘油累积量应足以抵消胞外渗透压的提高。

不同的酵母使用甘油作为相容性溶质的机理不同。但是, 一般而言, 酵母细胞用以增加胞内甘油浓度的方法主要有以下四种: (1) 合成代谢的增强; (2) 由于细胞质膜的变化引起的胞内甘油输出的减弱; (3) 降解代谢的减弱; (4) 从环境中吸取甘油<sup>[6]</sup>。例如, 在低水活度的环境中, 酿酒酵母主要以细胞内合成更多的甘油的方式来增加胞内甘油的累积。在胞内甘油合成增加的同时, 细胞同时也分泌更多的甘油至胞外, 维持了大约相同的胞内外甘油比。与此不同, 耐渗透压酵母 *Debaryomyces hansenii* 不是主要以细胞内合成更多的甘油的方式来增加胞内甘油的累积。而是在适当增加甘油合成的同时, 不仅降低胞内甘油的流失, 还从环境中吸收已经流失的甘油, 结果胞内外甘油浓度比可高达 10 000 倍。这种现象从不同酵母细胞在相同诱导条件下所产生的同种基因的表达强度的不同也可看出。当酿酒酵母细胞被转入含 10% 的 NaCl 的环境中时, GPD 活性被显示提高了 30 至 40 倍。而在同样情况下, *Debaryomyces hansenii* 细胞中的 GPD 活性仅提高 2 倍<sup>[22, 23]</sup>。

### 4 甘油合成的限速步骤

为了寻找提高酵母细胞甘油合成的有效办法,

Remize 等采用基因工程的方法对此做了较深入的研究。他们以酿酒酵母为对象研究分析了是否存在细胞中存在限制甘油合成代谢流的甘油合成或运输步骤。研究结果表明, 提高甘油合成的最直接的办法就是过量表达编码 3-磷酸甘油脱氢酶 GPDH 的同工酶 Gd1p 的基因 *GPD1*。过量表达另一同工酶 Gpd2p 的编码基因 *GPD2* 对甘油合成具有相同的功能。与此相反, 过量表达 3-磷酸甘油酯酶 Gpp1p 的编码基因 *GPP1* 并不能提高甘油的合成。进一步研究表明, 同时过量表达 *GPD1* 和 *GPP1* 的菌株并不能比仅仅过量表达 *GPD1* 的菌株生产更多的甘油。这表明 GPD, 而不是 Gpp1p, 为甘油合成的限制因素。

此外, 细胞膜上的甘油运输促进蛋白 Fps1p 也与胞内甘油合成有关。Fps1p 对甘油的运输是双向性的, 但主要是从细胞内输出甘油。但是, 当环境渗透压升高时, Fps1p 被关闭。Fps1p 的另一个功能是调节细胞膜的通透性。研究发现缺失 N-末端结构域一段区域的 Fps1p 突变株能组成性地释放胞内甘油。胞内产生这种 Fps1p 突变株的菌株在葡萄糖发酵过程中以增加胞内甘油合成来抵消胞内甘油的流失。因此, 这种细胞能合成更多的甘油。由此可见, 甘油输出是细胞合成甘油的另一限制因素<sup>[24]</sup>。

### 参考文献

[ 1 ] Singh K K, Norton R S. Metabolic changes induced during adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to a water stress. *Arch Microbiol*. 1991, 156( 1 ): 38~ 42

[ 2 ] Brown A D. Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Adv Microb Physiol*, 1978, 17: 181~ 242

[ 3 ] Meikle AJ, Reed RH, Gadd GM. The osmotic responses of *Saccharomyces cerevisiae* in K (+)-depleted medium. *FEMS Microbiol Lett*, 1991, 78: 89~ 94

[ 4 ] Blumberg A, Adler L. Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv Microb Physiol*, 1992, 33: 145~ 212

[ 5 ] Prior BA, Hohmann S. Glycerol production and osmoregulation. In: *Yeast Sugar Metabolism* (Zimmermann F K and Entian K D, eds), 1997, 313~ 337. Technomic, Lancaster.

[ 6 ] Hohmann S. Shaping up: The response of yeast to osmotic stress. In: *Yeast Stress Responses* (Hohmann S and Mager W H, Eds). 1997, 101~ 145. Springer Verlag, Heidelberg.

[ 7 ] Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, et al. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998 Dec; 62( 4 ): 1264~ 300. Review.

- [ 8 ] Posas F, Takekawa M, Saito H. Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1998, 1: 175~182
- [ 9 ] 诸葛健, 王正祥. 酵母 HOG 途径与甘油合成. *微生物学报*, 1999, 39(1): 68~74
- [ 10 ] Maeda T, Wungler-Murphy SM, Saito H. A two component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 1994, 369: 242~245
- [ 11 ] Maeda T, Takekawa M, Saito H. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3 containing osmosensor. *Science*, 1995, 269: 554~558
- [ 12 ] Posas F, Saito H. Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science*, 1997, 276: 1702~1705
- [ 13 ] Posas F, Wungler-Murphy SM, Maeda T. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two component" osmosensor. *Cell*, 1996 Sep 20; 86(6): 865~875
- [ 14 ] Posas F, Saito H. Activation of the yeast SSK2 MAP kinase by the SSK1 two component response regulator. *EMBO J.* 1998, 17(5): 1385~1394
- [ 15 ] Mager, WH, De Kruijff AJJ. Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol Rev*, 1995, 59: 506~531
- [ 16 ] Akhtar N, Blomberg A, Adler L. Osmoregulation and protein expression in a pbs2delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to hypersaline stress. *FEBS Lett*, 1997, 403: 173~180
- [ 17 ] Varela JCS, Mager WH. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to changes in external osmolarity. *Microbiology*, 1996, 142: 721~731
- [ 18 ] Martijn R, Marcus K, Johan M, et al. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 12: 8290~8300
- [ 19 ] Ansell R, Granath K, Hohmann S, et al. The two isoenzymes for yeast NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J.* 1997, 16(9): 2179~2187
- [ 20 ] Mager, WH, Varela JCS. Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. *Mol Microbiol.* 1993 Oct; 10(2): 253~258. Review.
- [ 21 ] Norbeck, J, Blomberg, A. Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4mol/L NaCl. Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via dihydroxyacetone pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 5544~5554
- [ 22 ] Blomberg A, Adler L. Roles of glycerol and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1991, 171: 1087~1092
- [ 23 ] Larsson C, Morales C, Gustafsson L, et al. Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *J Bacteriol*, 1990, 172: 1769~1774
- [ 24 ] Remize F, Barnavon L, Dequin S. Glycerol export and glycerol 3-phosphate dehydrogenase, but not glycerol phosphatase, are rate limiting for glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 2001, 3: 301~312

## Hyperosmoadaptation of Yeast Cells and Intracellular Accumulation of Glycerol

Yu Bingqi Zhu Gejian

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology Ministry of Education Southern Yangtze University Wuxi 214036)

**Abstract** Glycerol is the main compatible solute in *Saccharomyces cerevisiae* and many other yeasts. It is accumulated intracellularly when cells are exposed to decreased extracellular water activity. In general, increased intracellular accumulation of a solute may be caused by enhanced production, restricted dissimilation, increased retention by the plasma membrane and increased uptake from the medium. In this paper, we reviewed how the signal was converted to induce glycerol accumulation when extracellular osmolarity increases, the gene expression induced by hypertonic environment, the intracellular glycerol content in response to osmotic stress and the rate-limiting factors for glycerol production.

**Key words** Yeast Osmolarity Glycerol Yeast HOG pathway