产甘油假丝酵母HOG途径应答研究进展

陆信曜, 诸葛斌*, 宗红, 嵇豪

江南大学生物工程学院, 工业微生物教育部重点实验室, 工业微生物研究室, 无锡 214144

* 联系人, E-mail: bzhuge@126.com

收稿日期: 2019-03-20; 接受日期: 2019-04-30; 网络版发表日期: 2019-05-16

国家自然科学基金(批准号: 31570052)和国家轻工技术与工程一流学科自主课题(批准号: LITE2018-01)资助

摘要 产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*)是工业甘油生产菌株, 具有多重高抗逆、生长迅速、糖代谢高效等优点, 是优良的工业宿主菌株. 高渗甘油(high osmolarity glycerol, HOG)应答途径是真核细胞应答高渗透压胁迫的关键响应机制. 本文从产甘油酵母HOG途径的生物信息学分析、MAP激酶Hog1对细胞表型、甘油转运和合成、氨基酸的合成与转运调控进行阐述, 为进一步理解该酵母的HOG应答途径和抗逆机制奠定了基础.

关键词 产甘油假丝酵母, HOG途径应答, 调控

产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*)是一株高产甘油的工业菌株^[1]具有耗糖速率快、转化率高、发酵周期短等诸多优点^[2,3]. 作为一个二倍体工业酵母^[4], *C. glycerinogenes*具有良好的遗传稳定性, 能够耐受超高渗透压^[5]、氧化、高热^[6]和低pH等环境胁迫, 是潜在的优良工业底盘细胞. 数十年来已对该菌的基因组信息、生理生化以及代谢特征^[4,7-13]进行了深入研究. 进一步研究和认识*C. glycerinogenes*的环境胁迫耐受机制, 能为开发新一代高强度发酵菌株提供理论基础, 也可为模式菌株抗逆改造提供基因来源. 在真核生物中, 高渗甘油(high osmolarity glycerol, HOG)应答途径是细胞抵御渗透压胁迫的关键通路, 同时也参与了细胞对其他环境压力的应答. 本文通过对*C. glycerinogenes* HOG途径的生物信息学分析、Hog1蛋白对细胞表型的影响、HOG途径对甘油转运和合成的调控、HOG途径调控对氨基酸的合成与转运等进行

分析以对该菌HOG途径应答进行了综合阐述.

1 产甘油假丝酵母HOG途径的生物信息学分析

HOG途径是真核生物适应环境压力和形态调节的主要途径^[14], 主要由Sln1分支、Sho1分支和MAPK级联组成^[15]. 其中, Hog1介导的MAPK级联是HOG途径的核心要素. 它们由三激酶模块组成: MAP kinase kinase kinase(MAPKKK或MEKK), MAP kinase kinase(MAPKK或MEK)和MAP kinase(MAPK). 以模式生物*Saccharomyces cerevisiae*为例(图1A)^[16], Sln1分支由定位于质膜的渗透压感受器控制, 其与Ypd1和Ssk1构成*S. cerevisiae*的双组分系统. 在正常条件下时, 渗透压感受器Sln1处于自磷酸化的激活状态, 并通过Ypd1将磷酸化信号传递至Ssk1蛋白. 磷酸化的Ssk1失去活性,

引用格式: 陆信曜, 诸葛斌, 宗红, 等. 产甘油假丝酵母HOG途径应答研究进展. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 585-594

Lu X Y, Zhuge B, Zong H, et al. Advances in the HOG pathway of *Candida glycerinogenes* (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2019, 49: 585-594, doi: 10.1360/N052018-00258

图1 高渗甘油(HOG)应答途径^[16] A: *S. cerevisiae* HOG途径模型; B: *C. glycerinogenes* HOG途径模型

Figure 1 The high osmolarity glycerol (HOG) signal pathway^[16]. A: The HOG pathway of *S. cerevisiae*; B: the HOG pathway of *C. glycerinogenes*

从而沉默下游MAPK级联. 在高渗胁迫下, 细胞膨胀压力降低、体积萎缩、膜壁距离增大, 造成Sln1的自磷酸化程度减弱, 使得Ssk1快速去磷酸化并结合到Ssk2/Ssk22, 进而将磷酸化信号通过Pbs2传导至Hog1蛋白, 磷酸化的Hog1进入细胞核后通过招募转录因子等方式激活下游应答基因的表达. 当渗透压恢复正常后, 磷酸酶Ptp2, Ptp3和Ptc1复合物使得Hog1去磷酸化, 从而阻遏Sln1分支途径.

相比之下, Sho1分支不响应细胞膨胀压力的变化. 高渗下, 黏蛋白Hkr1, Msb2与跨膜蛋白Opy2, Sho1以及Ste50和鸟苷三磷酸酶(GTP酶)Cdc42的组合能够感知外界信号, 激活Ste20/Cla4, 从而激活Ste11, Pbs2和Hog1. 其中, Msb2和Hkr1监测细胞壁和质膜之间的运动, 但二者的功能是冗余的(图2)^[17]. 跨膜糖蛋白Opy2可将Ste50锚定于膜上(图3)^[18], Cdc24和Cdc42是激活Ste20的鸟嘌呤核苷酸交换因子, Bem1是一种支架蛋白能与Msb2结合并募集Ste20和Cla4(图3A)以激活激酶Ste11. Hkr1的胞质结构域也有助于Ste20激活Ste11, 但对渗透压下的激活是不必要的(图3C). 但Hkr1并不结合Bem1, 可能与其他蛋白结合将Ste20招募在膜上(图3B). 此外, Sho1可通过SH3结构域与Pbs2作用将Pbs2招募在膜上(图3). 也有一些真核生物(如*Aspergillus nidulans*)中的Pbs2同源物不含Sho1结合位点, 后来发现在Ste20中存在一种先前未被识别的可与Sho1结合的SH3结合基序(PLPPIP), 在Sho1的SH3结构域中不存在PXXP基序(核心保守的结合基序)的情况下可与Ste50结合, 导致Sho1能同时与Ste50和Ste20(或Pbs2)结

合. 当Sho1和Ste50间的相互作用间接地阻断Ste20和Ste11的相互作用时, Sho1与Pbs2和Ste50的相互作用也可以激活Ste11和Pbs2. 如果同时发生这些相互作用, 就存在图3C中描述的替代机制来激活Hog1. 综上所述, 这种对渗透压信号的组合感知机制极其复杂, 目前许多细节仍未清楚.

HOG途径在真核生物进化中较为保守, 但不同生物的HOG途径也存在差异. 随着*C. glycerinogenes*全基因组测序的完成及遗传操作工具的完善, 鉴定了CgHOG途径的关键组分及其功能, 比较了*C. glycerinogenes*与模式菌株*S. cerevisiae* HOG组分的异同(图3), 初步绘制了*C. glycerinogenes*的HOG途径(图1B). 其中, *C. glycerinogenes*的Sln1分支途径较为完整. 与*S. cerevisiae*的Sln1相比, *C. glycerinogenes*的Sln1缺少HAMP结构域. 已有的研究表明, HAMP结构域参与调节同源二聚体受体的磷酸化或甲基化, 并通过改变周质配体结合结构域的构象将胞质信号传导给胞质激酶和甲基受体结构域. 但该结构域的缺失是否影响*C. glycerinogenes* Sln1分支途径的信号传递效率尚不清楚. *C. glycerinogenes*的Sho1分支具有Sho1, Opy2, Cdc42, Ste20和Ste50等大部分的*S. cerevisiae*同源蛋白, 但未发现两个渗透压感受器黏蛋白Msb2和Hkr1的同源物. 而在*S. cerevisiae*中, Msb2和Hkr1除参与渗透压信号感知外, 还参与多种信号途径, 如Cdc42p和MAP激酶依赖性丝状生长信号通路等^[19], 这两个蛋白的缺失对*C. glycerinogenes*中上述信号通路的影响有待进一步研究. 与此同时, 在*S. cerevisiae*中参与细胞芽位

图 2 Sho1 分支激活 HOG 途径的模型^[17]。红色箭头表示信号流, 蓝色箭头表示蛋白质-蛋白质相互作用。A: Msb2 感知渗透压激活 Hog1; B: Hkr1 感知渗透压激活 Hog1; C: Hog1 激活的替代机制

Figure 2 Structure of Sho1 branch activates HOG pathway^[17]. Red arrows indicate signal flow, blue arrows indicate protein-protein interactions. A: Msb2 senses osmotic stress to activate Hog1; B: Hkr1 senses osmotic stress to activate Hog1; C: Other components activate Hog1

点选择的 Cdc24 在 *C. glycerinogenes* 也是缺失的, 敲除该基因导致 *S. cerevisiae* 出现异常核形态的大型细胞以及异常的交配缺陷。 *C. glycerinogenes* 以出芽的方式进行无性繁殖, Cdc24 的缺失并未影响到这一功能, 因此可能还存在其他类似的机制。 Ste11 是 Sho1 分支的一个关键激酶, 对下游 Pbs2 的有效激活至关重要, 其中 Ras_bdg_2 结构域是几种蛋白激酶的结合和相互作用区域。 然而, SMART 工具预测发现, *C. glycerinogenes* HOG 途径中的 Ste11 缺少该结构域。 *C. glycerinogenes* 的 STE11 在 *S. cerevisiae* STE11ΔSSK2ΔSSK22Δ 中异源表达后, 重组菌株在 1 mol/L NaCl 浓度下仍然表现出渗透压敏感的性质^[18], 表明缺少该结构域的 *C. glycer-*

inogenes Ste11 不具有保守的生物学功能。 在 *S. cerevisiae* 中, Bem1 是参与细胞极性和形态的一种支架蛋白, 其 PBI 结构域介导蛋白的异二聚化或同源寡聚化, 在蛋白质的结合模块起作用。 而信息学分析发现, *C. glycerinogenes* 的 Bem1 并没有 PBI 结构域, 这可能与 Msb2 和 Hkr1 的缺失有关。 此外, *C. glycerinogenes* 具有 *S. cerevisiae* 中不存在的组氨酸蛋白激酶 Nik1 的同源蛋白。 已有研究发现, Nik1 激酶在 *Candida albicans*, *Wallemia ichthyophaga*, *Aspergillus fumigatus* 等微生物中作为 HOG 途径的一部分参与了渗透压应激和氧化压力的响应过程^[20,21]。 *C. glycerinogenes* 的 Nik1 激酶具有四个连续重复的 HAMP 结构域, 其他结构与 Sln1 相同。 因此 Nik1 激酶可能起到了补充 Sln1 部分功能的作用, 并作为 *C. glycerinogenes* 的 Sln1 分支的一部分参与 HOG 途径的响应。 以上结果表明, *C. glycerinogenes* 由于 Sho1 分支相关蛋白的缺陷而可能仅依赖于 Sln1 分支激活 HOG 途径, 这与 *C. albicans* 和 *Aspergillus nidulans* 等菌株类似^[22,23]。 而 Sln1 分支具有比 Sho1 分支更广的渗透压感知范围及对下游关键分子 Pbs2 更强的激活作用, 这可能是 *C. glycerinogenes* HOG 途径应答渗透压胁迫比 *S. cerevisiae* 更高效的重要原因。

2 Hog1 蛋白对细胞表型的影响

HOG1 基因编码的 Hog1 MAPK 蛋白是 HOG 途径的核心分子。 当外界压力(渗透压、氧化、冷、热、酸、金属离子、姜黄素)存在时, Hog1 上游支路被激活, 引起 Hog1 发生双重磷酸化, 双重磷酸化的 Hog1 快速转移至细胞核后通过招募转录因子等机制引发下游压力应答基因转录变化^[24-29]。 基因组注释获得的 *C. glycerinogenes* CgHOG1 基因与 *S. cerevisiae* 的 ScHOG1 具有高度同源性(68.3%)^[5]。 已有的研究表明, HOG1 蛋白的核心功能是传递磷酸化信号以启动下游途径、快速响应外界渗透压胁迫^[30]。 在 *S. cerevisiae* HOG1Δ 中异源表达 CgHOG1 能够恢复缺陷型菌株在渗透压下的生长能力。 此外, 以 1 mol/L NaCl 对互补菌株进行短时间冲击能够显著增强 CgHog1 蛋白的磷酸化程度。 因此, 可以认为 CgHog1 具有与 ScHog1 类似的保守功能, 是 *C. glycerinogenes* HOG 途径核心分子。

对 *C. glycerinogenes* HOG1Δ 的分析发现, 缺陷菌株在常规培养下更容易形成菌丝; 而回补表达 CgHOG1

	直系同源	基因数量(Sc/Cg)	氨基酸数(Sc/Cg)	相似性(Sc/Cg)	结构(Sc/Cg)	
Sho1分支上的蛋白	Msb2	1/0	1306/0	—		—
	Hkr1	1/0	1802/0	—		—
	Sho1	1/1	367/322	29.8%		
	Opy2	1/1	356/463	30.0%		
	Bem1	1/1	552/600	31.6%		
	Cdc24	1/1	855/0	—		—
	Cdc42	1/1	191/195	80.0%		
	Ste20	1/1	939/1246	67.0%		
	Ste50	1/1	346/343	31.3%		
	Cla4	1/1	842/797	52.0%		
	Ste11	1/1	717/421	33.0%		
Sln1分支上的蛋白	HKS					
	Sln1	1/1	1220/1139	37.3%		
	Nik1	0/1	0/1059	—	—	—
	Ypd1	1/1	167/151	36.0%		
	Ssk1	1/1	712/704	48.0%		
	Ssk2	2/1	1579, 1331/1743	37.0%, 36.0%		
	Pbs2	1/1	668/701	35.2%		
MAPK	Hog1	1/1	435/387	68.3%		

图 3 基于基因组测序预测的*C. glycerinogenes* HOG途径同源蛋白^[18]
Figure 3 *C. glycerinogenes* HOG pathway homologous protein predicted by genome sequencing analysis^[18]

后,其菌丝形成能力恢复至野生菌水平.文献报道一些病原真菌的Hog1也参与了阻遏菌丝形成的过程^[31,32].在致病模式酵母*C. albicans*中,*HOG1*的缺失能够上调菌丝形成相关基因(*HWPI*, *ECE1*, *RBT2/4/5*)的转录水平,促进菌丝的形成^[33].现有的研究认为,磷酸化的Hog1可能与菌丝形成途径产生交互作用进而限制菌丝的形成^[34].因此,Hog1对菌丝形成的负调控作用在假丝酵母中可能也具有较好的保守性.作为HOG途径的核心分子,不同微生物中Hog1均对菌株的渗透压耐受性具有重要影响.无压力条件下,*C. glycerinogenes* *HOG1Δ*表现出一定的生长延迟,但最终生物量未受影响.0.1 mol/L NaCl下生长明显抑制,而提高NaCl浓度至0.2 mol/L后缺陷菌的生长则几乎被完全抑制.相比之下,*S. cerevisiae*, *C. albicans*和*Kuyveromyces lactis*缺失*HOG1*后均可在中等渗透压下保持一定的生长能力^[35-37].其中,*S. cerevisiae* *HOG1Δ*在0.5 mol/L NaCl下

才表现出明显的生长缺陷.可见,与*S. cerevisiae*等菌株相比,*C. glycerinogenes*更依赖于Hog1及其调控的信号途径以应对外界渗透压胁迫.虽然HOG途径及Hog1蛋白对酵母的渗透压耐受性至关重要,但其主要参与短期内细胞对外界渗透压胁迫的快速响应,过表达HOG途径则会导致下游基因的长时间激活,造成细胞死亡^[38].因此,异源过表达*C. glycerinogenes* HOG途径单个基因并不能提高菌株渗透压耐受性.未来对*C. glycerinogenes* HOG途径的调控、信号传导、下游靶基因等细节的深入挖掘才能为改造提高其他菌株抗逆性能提供理论基础和基因资源.

与*S. cerevisiae*和*C. albicans*类似,*CgHOG1*的缺失还显著降低了*C. glycerinogenes*对氧化和酸胁迫的耐受性^[39].在*C. albicans*中,HOG上游的Sln1分支途径参与氧化胁迫的信号传导,激活下游MAPK级联途径以提高细胞生存能力.高温下,*S. cerevisiae*通过Sln1分

支途径激活Hog1抵御热压力损伤,而缺失*ScHOG1*则使细胞对高温更为敏感^[40]。但是,在*Kluyveromyces marxianus*与*C. glycerinogenes*中,缺失*HOG1*并没有显著影响菌株抵抗热压力的能力^[41],表明在这两株菌中Hog1对热应答基因的调控较弱。最近的研究发现,与*S. cerevisiae*相比,*C. glycerinogenes*在高温下基因应答更具功能互补性和系统性。此外,积累海藻糖是*S. cerevisiae*抵抗热胁迫的重要方式^[42]。而在*C. glycerinogenes*中,热胁迫并未影响海藻糖途径但却使得氨基酸合成途径发生上调^[6],进一步说明两者的热胁迫应答机制存在较大差异。此外,缺失*HOG1*后*C. glycerinogenes*与*C. albicans*均呈现对荧光增白剂更好的耐受性^[18,25]。已有的研究认为,HOG途径可能与细胞壁完整性途径存在交互作用,敲除*HOG1*能够激活细胞壁发生途径的关键分子Cek1 MAPK,从而影响下游基因的表达,增强对细胞壁抑制剂的耐受^[25]。

3 HOG途径对甘油转运和合成的调控

3.1 HOG途径调控甘油合成

甘油作为重要的相容性物质,通过维持细胞稳态以抵御外界渗透压。已有的研究表明,在高渗透压条件下,Hog1调控甘油合成关键酶基因*GPD1*,*GPP1*等的表达,促进胞内甘油积累以应对外界渗透压的胁迫^[43]。与*S. cerevisiae*不同,*C. glycerinogenes*只存在单一的*Gpd*编码基因^[44,45],并且未发现*GPP*的同源基因。KEGG数据库分析也发现*Yarrowia lipolytica*和*Pichia pastoris*不具有*Gpp*的同源蛋白。现有的研究认为,作为一株高产甘油的工业生产菌株,*C. glycerinogenes*可能存在一个非典型的磷酸水解酶参与甘油合成。

*Gpd*是甘油合成的关键限速酶。在高浓度葡萄糖(350 g/L)下,*C. glycerinogenes GPDΔ*表现出一定的生长延迟,但最终生物量未受影响。此外,*CgGPD*缺失菌对中等渗透压(0.7 mol/L NaCl)保持了较好的耐受能力,仅在极限条件下(450 g/L葡萄糖、1.5 mol/L NaCl)*CgGPD*缺陷菌的生长才被完全抑制。相比之下,*S. cerevisiae GPD1ΔGPD2Δ*在150 g/L葡萄糖浓度的条件下几乎完全不能生长^[46]。因此,*C. glycerinogenes*在抵御外界渗透压过程中可能还存在胞内甘油积累以外的保护机制以抵御中等渗透压。在*S. cerevisiae*中,除了调控甘油合成关键酶基因的转录及酶活水平以外,代谢调

节在渗透压响应过程中起到的作用比酶的从头合成更加迅速且高效^[47]。在适应渗透压的过程中,Hog1通过激活代谢物对酶的别构调节来调控糖酵解途径,引导碳流指向甘油合成^[48]。Hog1还可以通过激活2-磷酸果糖激酶,从而增加糖酵解途径的通量,提高甘油前体物质的积累^[43]。

3.2 HOG途径调控甘油的转运

在高渗透压下,除控制甘油合成外,Hog1还可通过调节细胞内甘油的流入和流出来实现甘油在胞内的快速积累。已有报道糖转运类似蛋白*Stt1*控制酵母的甘油摄取,在细胞渗透压调节和甘油分解代谢等生理过程中都具有重要作用^[49]。在*S. cerevisiae*中,*Stt1*的表达受葡萄糖阻遏,但在高渗下Hog1会激活*Stt1*的表达^[50-53]。缺失*STL1*的*S. cerevisiae*完全失去向胞内转运甘油的能力,不能在甘油为唯一碳源的培养基上生长^[49]。与*S. cerevisiae*不同,*C. glycerinogens*存在两个甘油转运蛋白*CgStt1*与*CgStt2*。已有文献报道,一些耐渗酵母通常会含有多个拷贝的*STL1*同源基因,如*Debaryomyces hansenii*(8个),*Y. lipolytica*(6个),*Pichia stipitis*(3个)^[53,54]。*C. glycerinogens*单个*STL*基因缺失不影响菌株在甘油培养基中的生长,且双基因缺失也并未完全抑制细胞在甘油培养基上的生长。因此,*C. glycerinogens*除了利用*CgStt1*与*CgStt2*吸收甘油外,还存在其他的甘油摄取方式。

在*C. glycerinogens*中,两个*STL*基因受到不同的转录调节。其中,*CgSTL1*在Hog1调控下受外界渗透压诱导,而*CgSTL2*呈组成型方式表达^[55]。*Zygosaccharomyces rouxii*同样具有两个同源*STL*基因,其中*ZrSTL1*在渗透压下起主要作用^[54]。而*Pachysolen tannophilus*中的两个*STL*则完全不具有甘油摄取的能力^[56]。另一项研究也表明不同酵母菌株(*S. cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces uvarum*和*Saccharomyces kudriavzevii*)中*STL1*基因在渗透压下的表达模式各不相同^[57],表明*STL*表达调控模式的保守性较差。在*S. cerevisiae*中,Hog1除调控*Stt1*的表达激活甘油摄取外,还可通过激活甘油-水通道蛋白*Fps1*表达控制甘油的外排。高渗下,*Fps1*在Hog1和两个甘油通道调节蛋白*Rgc1*和*Rgc2*的协助下快速关闭甘油运输通道,将甘油截留在胞内以维持渗透压平衡^[58]。与*S. cerevisiae*不同,致病酵母*C. glabrata*存在两个同源的甘油-水通道

蛋白Fps1参与外界渗透压响应^[59]。 *C. glycerinogenes*能够在胞外大量积累甘油, 但基因组测序却未能获得Fps1的同源蛋白, 仅注释得到一个水通道蛋白Aqy1^[18]。因此, *C. glycerinogenes*的甘油输出过程可能依赖于某个未知的转运方式, 也可能不存在类似甘油输出通道关闭的渗透压响应机制^[18], 未来对该菌甘油跨膜转运的研究有望获得全新的机制和高效基因元件。

4 HOG途径对氨基酸合成与转运的调控

除甘油外, 氨基酸类物质也是重要的渗透压保护剂^[42]。 *C. glycerinogenes*高渗下的转录组分析发现, 多个氨基酸合成与转运相关基因上调^[18]。其中, 位于胞浆的精氨酸合成途径关键酶基因*ARG3*, *ARG4*转录上调, 而其分解途径中的*CAR1*, *CAR2*转录下调。同时, 脯氨酸相关基因*PUT1*, *PUT2*显著上调, 表明渗透压诱导脯氨酸降解以促进下游精氨酸合成。此外, 在*C. glycerinogenes* *HOG1*缺失菌中, 大部分精氨酸代谢途径相关基因均未发生显著差异表达^[18]。渗透压下, *C. glycerinogenes*胞内精氨酸浓度显著升高, 但*HOG1*缺失后细胞失去了渗透下精氨酸积累的能力^[18], 表明在高渗透压下Hog1调控精氨酸积累以抵御外界渗透压。与*C. glycerinogenes*类似, *C. glabrata*高渗透压下精氨酸代谢途径相关基因也发生显著的差异表达^[60]。 *S. cerevisiae*中调节氨基酸合成也参与细胞对氧化胁迫^[61]和冷胁迫^[62]的耐受, 但并发现精氨酸积累参与细胞渗透压响应。

除精氨酸外, 渗透压也诱导 γ -氨基丁酸(gamma amino butyric acid, GABA)在*C. glycerinogenes*胞内的

积累^[18,63]。虽然渗透压下GABA合成关键基因*GAD1*未见变化, 但GABA转运基因*UGA4*和*GAP1*显示上调^[18]。同时, 外源添加GABA或过表达*GAD1*基因均能有效增强*C. glycerinogenes*的高渗透压耐受性^[63]。GABA已被报道在氧化胁迫^[64]、热胁迫^[65]等过程中起到广泛的作用。在*S. cerevisiae*中, GABA通过减少活性氧积累来增强细胞耐热性^[66,67]。此外, Bach等人^[66]研究发现酵母在生长过程中有大量的GABA被贮存在胞内, 推测GABA可能具有与精氨酸和脯氨酸类似的功能。而对*C. glycerinogenes*的研究则首次发现HOG途径直接调控GABA的积累以应答渗透压胁迫。

已有的研究发现, 以Hog1为核心的*C. glycerinogenes*环境胁迫应答系统对下游基因具有更强、更广泛和系统的调控能力。基于上述对*C. glycerinogenes* HOG途径的研究, 获得了大量不同特征的抗逆元件、底物转运蛋白^[68]和启动子^[69~71], 建立了*C. glycerinogenes*表达系统^[72~76]。在此基础上, 利用基因工程技术手段, 以*C. glycerinogenes*为生物转化平台, 实现了环境胁迫条件下木糖醇^[77]、木糖酸^[78]等的高效合成。然而, 目前对*C. glycerinogenes* HOG途径及高抗逆机制的研究集中在途径基因的注释和功能验证, 与*S. cerevisiae*在途径基因组成、关键基因功能、下游调控基因等方面的细节比较尚有待深入。后续对Sho1分支的生理功能、甘油合成和转运基因的挖掘、HOG途径基因与高温等环境胁迫的关系等方面的研究能够加深对微生物环境胁迫应答机制的理解, 进一步完善对*C. glycerinogenes* HOG的认识, 同时为基因工程改造*C. glycerinogenes*和模式菌株提供基因资源。

参考文献

- 1 Wang Z X, Zhuge J, Fang H, et al. Glycerol production by microbial fermentation: A review. *Biotechnol Adv*, 2001, 19: 201–223
- 2 Guo X N, Zhuge B. Screening *Candida glyceroligenes* mutants with high productivity and the fermentation performance of the mutants (in Chinese). *J Food Sci Biotech*, 2002, 21: 336–339 [郭雪娜, 诸葛斌. 高强度产甘油假丝酵母突变株的选育及其发酵性状. 食品与生物技术学报, 2002, 21: 336–339]
- 3 Zhuge B, Guo X N, Mawadza C, et al. A novel *Candida glyceroligenes* mutant with high glycerol productivity in high phosphate concentration medium. *World J Microbiol Biotechnol*, 2005, 21: 453–456
- 4 Song B P. The Physiological and Biochemical Characteristics and Ploidy of *C. glyceroligenes* and Its Metabolism of Different Carbon Sources (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Wuxi: Southern Yangtze University, 2012. 1–47 [宋保平. 产甘油假丝酵母生理生化特性、倍性及不同碳源发酵代谢的研究. 硕士学位论文. 无锡: 江南大学, 2012. 1–47]
- 5 Ji H, Lu X, Wang C, et al. Identification of a novel HOG1 homologue from an industrial glycerol producer *Candida glyceroligenes*. *Curr*

- Microbiol*, 2014, 69: 909–914
- 6 Yang F, Lu X, Zong H, et al. Gene expression profiles of *Candida glycerinogenes* under combined heat and high-glucose stresses. *J Biosci Bioeng*, 2018, 126: 464–469
 - 7 Xie T. Effects of Phosphate-limitation on glycerol biosynthesis and intracellular phosphorus accumulation of *Candida glycerinogenes* (in Chinese). *Microbiol China*, 2009, 36: 1289–1293 [谢涛. 限磷对产甘油假丝酵母甘油合成与胞内磷积累的影响. *微生物学通报*, 2009, 36: 1289–1293]
 - 8 Xie T, Fang H Y, Zhuge J. Effects of phosphorus sources on the production of *Candida glycerinogenes* fermentation and kinetic analysis (in Chinese). *J Chem Ind Eng*, 2005, 56: 2404–2409 [谢涛, 方慧英, 诸葛健. 磷源对产甘油假丝酵母发酵生产甘油的影响及动力学分析. *化工学报*, 2005, 56: 2404–2409]
 - 9 Xie T. Stimulatory effects of some amino acids on glycerol production by *Candida glycerinogenes* (in Chinese). *Chin J Biotech*, 2006, 22: 138–143 [谢涛. 一些氨基酸对产甘油假丝酵母甘油生产的促进作用. *生物工程学报*, 2006, 22: 138–143]
 - 10 Jiao C, Zhuge B, Fang H Y, et al. Effects of dissolved oxygen on metabolic flow distribution in glycerol-producing fermentation (in Chinese). *J Chem Ind Eng*, 2012, 63: 1156–1167 [焦策, 诸葛斌, 方慧英, 等. 溶氧对产甘油发酵代谢流分布的影响. *化工学报*, 2012, 63: 1156–1167]
 - 11 Xie T, Fang H Y, Zhuge J. Mechanism of corn steep liquor during glycerol fermentation by *Candida glycerinogenes* (in Chinese). *Microbiol China*, 2006, 33: 80–84 [谢涛, 方慧英, 诸葛健. 玉米浆在产甘油假丝酵母甘油发酵中的作用机理. *微生物学通报*, 2006, 33: 80–84]
 - 12 Xie T, Fang H Y, Zhuge J, et al. Effects of osmotic pressure on glycerol synthesis and intracellular phosphorus accumulation in *Candida glyceropoesis* (in Chinese). *J Chin Biotechnol*, 2009: 61–66 [谢涛, 方慧英, 诸葛斌, 等. 渗透压对产甘油假丝酵母甘油合成与胞内磷积累的影响. *中国生物工程杂志*, 2009: 61–66]
 - 13 Xie T, Fang H Y, Zhuge J, et al. Effects of temperature on the fermentation process of *Candida glyceropoesis* (in Chinese). *Chem Eng*, 2009, 37: 55–58 [谢涛, 方慧英, 诸葛斌, 等. 温度对产甘油假丝酵母产甘油发酵过程的影响. *化学工程*, 2009, 37: 55–58]
 - 14 Krantz M, Becit E, Hohmann S. Comparative genomics of the HOG-signalling system in fungi. *Curr Genet*, 2006, 49: 137–151
 - 15 de Nadal E, Ammerer G, Posas F. Controlling gene expression in response to stress. *Nat Rev Genet*, 2011, 12: 833–845
 - 16 Krantz M, Becit E, Hohmann S. Comparative analysis of HOG pathway proteins to generate hypotheses for functional analysis. *Curr Genet*, 2006, 49: 152–165
 - 17 de Dios C H, Roman E, Alonso Monge R, et al. The role of MAPK signal transduction pathways in the response to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida albicans*: Implications in virulence. *Curr Protein Peptide Sci*, 2010, 11: 693–703
 - 18 Ji H. *Candida glycerinogenes* HOG Reply Way and Osmotic Tolerance Mechanism Research (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Wuxi: Jiangnan University, 2018 [嵇豪. *Candida glycerinogenes* HOG应答途径及渗透压耐受机制研究. 博士学位论文. 无锡: 江南大学, 2018]
 - 19 Rodríguez-Peña J M, García R, Nombela C, et al. The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: A yeast dialogue between MAPK routes. *Yeast*, 2010, 27: 495–502
 - 20 Cheetham J, Smith D A, da Silva Dantas A, et al. A single MAPKKK regulates the Hog1 MAPK pathway in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 2007, 18: 4603–4614
 - 21 Furukawa K, Hoshi Y, Maeda T, et al. *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Mol Microbiol*, 2010, 56: 1246–1261
 - 22 El-Mowafy M, Bahgat M M, Bilitewski U. Deletion of the HAMP domains from the histidine kinase CaNik1p of *Candida albicans* or treatment with fungicides activates the MAP kinase Hog1p in *S. cerevisiae* transformants. *BMC Microbiol*, 2013, 13: 209
 - 23 Hagiwara D, Suzuki S, Kamei K, et al. The role of AtfA and HOG MAPK pathway in stress tolerance in conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genets Biol*, 2014, 73: 138–149
 - 24 Posas F, Wurgler-Murphy S M, Maeda T, et al. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 “two-component” osmosensor. *Cell*, 1996, 86: 865–875
 - 25 Eisman B, Alonso-Monge R, Román E, et al. The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamydospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5: 347–358
 - 26 Azad G K, Singh V, Thakare M J, et al. Mitogen-activated protein kinase Hog1 is activated in response to curcumin exposure in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiol*, 2014, 14: 317
 - 27 Lawrence C L, Botting C H, Antrobus R, et al. Evidence of a new role for the high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway

- in yeast: Regulating adaptation to citric acid stress. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 3307–3323
- 28 Wang H, He Z, Luo L, et al. An aldo-keto reductase, Bbakr1, is involved in stress response and detoxification of heavy metal chromium but not required for virulence in the insect fungal pathogen, *Beauveria bassiana*. *Fungal Genets Biol*, 2018, 111: 7–15
- 29 Saito H, Posas F. Response to hyperosmotic stress. *Genetics*, 2012, 192: 289–318
- 30 Thorsen M, Di Y, Tängemo C, et al. The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in Yeast. *Mol Biol Cell*, 2006, 17: 4400–4410
- 31 Zheng D, Wang Y, Han Y, et al. UvHOG1 is important for hyphal growth and stress responses in the rice false smut fungus *Ustilaginoidea virens*. *Sci Rep*, 2016, 6: 24824
- 32 Zheng D, Zhang S, Zhou X, et al. The FgHOG1 pathway regulates hyphal growth, stress responses, and plant infection in *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE*, 2012, 7: e49495
- 33 Enjalbert B, Smith D A, Cornell M J, et al. Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 2005, 17: 1018–1032
- 34 Hohmann S. An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Curr Genet*, 2015, 61: 373–382
- 35 Kayingo G, Wong B. The MAP kinase Hog1p differentially regulates stress-induced production and accumulation of glycerol and D-arabitol in *Candida albicans*. *Microbiology*, 2005, 151: 2987–2999
- 36 Kawasaki L, Castañeda-Bueno M, Sánchez-Paredes E, et al. Protein kinases involved in mating and osmotic stress in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryotic Cell*, 2008, 7: 78–85
- 37 Duskova M, Borovikova D, Herynkova P, et al. The role of glycerol transporters in yeast cells in various physiological and stress conditions. *FEMS Microbiol Lett*, 2015, 362: 1–8
- 38 Krantz M, Ahmadpour D, Ottosson L G, et al. Robustness and fragility in the yeast high osmolarity glycerol (HOG) signal-transduction pathway. *Mol Syst Biol*, 2009, 5: 281
- 39 Ji H, Zhuge B, Zong H, et al. Role of CgHOG1 in stress responses and glycerol overproduction of *Candida glycerinogenes*. *Curr Microbiol*, 2016, 73: 827–833
- 40 Winkler A, Arkind C, Mattison C P, et al. Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryot Cell*, 2002, 1: 163–173
- 41 Qian J, Qin X, Yin Q, et al. Cloning and characterization of *Kluyveromyces marxianus* Hog1 gene. *Biotechnol Lett*, 2011, 33: 571–575
- 42 Guan N, Li J, Shin H D, et al. Microbial response to environmental stresses: From fundamental mechanisms to practical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101: 3991–4008
- 43 Dihazi H, Kessler R, Eschrich K. High osmolarity glycerol (HOG) pathway-induced phosphorylation and activation of 6-phosphofructo-2-kinase are essential for glycerol accumulation and yeast cell proliferation under hyperosmotic stress. *J Biol Chem*, 2004, 279: 23961–23968
- 44 Chen X, Fang H, Zhuge B, et al. Heterologous expression of the osmotolerant yeast *Candida glycerolgenesis* glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene (CgGPD) in *Saccharomyces cerevisiae* lacking the HOG pathway. *Process Biochem*, 2013, 48: 1469–1475
- 45 Chen X, Fang H, Rao Z, et al. Cloning and characterization of a NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene from *Candida glycerinogenes*, an industrial glycerol producer. *FEMS Yeast Res*, 2008, 8: 725–734
- 46 Ding W T, Zhang G C, Liu J J. 3' Truncation of the *GPD1* promoter in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield and productivity. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79: 3273–3281
- 47 Bouwman J, Kiewiet J, Lindenberg A, et al. Metabolic regulation rather than *de novo* enzyme synthesis dominates the osmo-adaptation of yeast. *Yeast*, 2011, 28: 43–53
- 48 Hohmann S, Krantz M, Nordlander B. Yeast osmoregulation. *Method Enzymol*, 2007, 428: 29–45
- 49 Ferreira C, van Voorst F, Martins A, et al. A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 2068–2076
- 50 Bai C, Tesker M, Engelberg D. The yeast Hot1 transcription factor is critical for activating a single target gene, *STL1*. *Mol Biol Cell*, 2015, 26: 2357–2374
- 51 Ferreira C, Lucas C. Glucose repression over *Saccharomyces cerevisiae* glycerol/H⁺ symporter gene *STL1* is overcome by high temperature. *FEBS Lett*, 2007, 581: 1923–1927
- 52 Gomar-Alba M, Amaral C, Artacho A, et al. The C-terminal region of the Hot1 transcription factor binds GGGACAAA-related sequences in the

- promoter of its target genes. *Biochim Biophys Acta (BBA)*, 2015, 1849: 1385–1397
- 53 Palma M, Goffeau A, Spencer-Martins I, et al. A phylogenetic analysis of the sugar porters in hemiascomycetous yeasts. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2007, 12: 241–248
 - 54 Dušková M, Ferreira C, Lucas C, et al. Two glycerol uptake systems contribute to the high osmotolerance of *Zygosaccharomyces rouxii*. *Mol Microbiol*, 2015, 97: 541–559
 - 55 Ji H, Lu X, Zong H, et al. Functional and expression studies of two novel *STL1* genes of the osmotolerant and glycerol utilization yeast *Candida glycerinogenes*. *J Gen Appl Microbiol*, 2018, 64: 121–126
 - 56 Liu X, Mortensen U H, Workman M. Expression and functional studies of genes involved in transport and metabolism of glycerol in *Pachysolen tannophilus*. *Microb Cell Fact*, 2013, 12: 27
 - 57 Pérez-Torrado R, Oliveira B M, Zemančíková J, et al. Alternative glycerol balance strategies among *Saccharomyces* species in response to winemaking stress. *Front Microbiol*, 2016, 7: 435
 - 58 Lee J, Reiter W, Dohnal I, et al. MAPK Hog1 closes the *S. cerevisiae* glycerol channel Fps1 by phosphorylating and displacing its positive regulators. *Genes Dev*, 2013, 27: 2590–2601
 - 59 Beese-Sims S E, Pan S J, Lee J, et al. Mutants in the *Candida glabrata* glycerol channels are sensitized to cell wall stress. *Eukaryotic Cell*, 2012, 11: 1512–1519
 - 60 Xu S, Zhou J, Liu L, et al. Arginine: A novel compatible solute to protect *Candida glabrata* against hyperosmotic stress. *Process Biochem*, 2011, 46: 1230–1235
 - 61 Nishimura A, Kotani T, Sasano Y, et al. An antioxidative mechanism mediated by the yeast *N*-acetyltransferase Mpr1: Oxidative stress-induced arginine synthesis and its physiological role. *FEMS Yeast Res*, 2010, 10: 687–698
 - 62 Morita Y, Nakamori S, Takagi H. Effect of proline and arginine metabolism on freezing stress of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng*, 2002, 94: 390–394
 - 63 Ji H, Lu X, Zong H, et al. γ -aminobutyric acid accumulation enhances the cell growth of *Candida glycerinogenes* under hyperosmotic conditions. *J Gen Appl Microbiol*, 2018, 64: 84–89
 - 64 Coleman S T, Fang T K, Rovinsky S A, et al. Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2001, 276: 244–250
 - 65 Li Z, Yu J, Peng Y, et al. Metabolic pathways regulated by γ -aminobutyric acid (GABA) contributing to heat tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Sci Rep*, 2016, 6: 30338
 - 66 Bach B, Meudec E, Lepoutre J P, et al. New insights into-aminobutyric acid catabolism: Evidence for-hydroxybutyric acid and polyhydroxybutyrate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75: 4231–4239
 - 67 Cao J, Barbosa J M, Singh N K, et al. GABA shunt mediates thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen production. *Yeast*, 2013, 30: 129–144
 - 68 Liang Z, Liu D, Lu X, et al. Identification and characterization from *Candida glycerinogenes* of hexose transporters having high efficiency at high glucose concentrations. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102: 5557–5567
 - 69 Ding C S, Rao Z M, Zhuge B, et al. Analysis of CgGPD gene promoter from *Candida glycerinogenes* by fluorescent protein (in Chinese). *Acta Microbiol Sin*, 2008, 48: 1013–1018 [丁春生, 饶志明, 诸葛斌, 等. 利用荧光蛋白研究产甘油假丝酵母胞浆3-磷酸甘油脱氢酶基因CgGPD启动子. *微生物学报*, 2008, 48: 1013–1018]
 - 70 Zhu J L, Zhuge B, Fang H Y, et al. New osmo-regulatory promoters in the industrial yeast (in Chinese). *Acta Microbiol Sin*, 2015, 11: 55 [朱佳莉, 诸葛斌, 方慧英, 等. 新型渗透压调控的工业酵母启动子. *微生物学报*, 2015, 11: 55]
 - 71 Zhang C, Zhuge B, Zhan X, et al. Cloning and characterization of a novel NAD⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Candida glycerinogenes* and use of its promoter. *Yeast*, 2013, 30: 157–163
 - 72 Li Y, Shen W, Wang Z, et al. Isolation and sequence analysis of the geneURA3 encoding the orotidine-5'-phosphate decarboxylase from *Candida glycerinogenes* WL2002-5, an industrial glycerol producer. *Yeast*, 2002, 22: 423–430
 - 73 Xu D. The Construction of An Expression Vector Using 18S rDNA As integration Site for the Host of *Candida glycerinogenes* WL2002-5 (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Southern Yangtze University, 2014 [徐丹. 产甘油假丝酵母WL2002-5以18S rDNA为整合位点的表达体系的构建. 硕士学位论文. 江南大学, 2014]
 - 74 Chen X Z, Rao Z M, Shen W, et al. A Transformation system for *Candida glycerinogenes*, based on Zeocin resistance (in Chinese). *Acta Laser*

- Biol Sin, 2008, 17 [陈献忠, 饶志明, 沈微, 等. 以Zeocin抗性基因为选择标记的*Candida glycerinogenes*遗传转化. 激光生物学报, 2008, 17]
- 75 Chen X, Fang H, Rao Z, et al. An efficient genetic transformation method for glycerol producer *Candida glycerinogenes*. *Microbiol Res*, 2008, 163: 531–537
- 76 Shen W, Wang Z X, Rao Z M, et al. A genetic transformation system based on trp1 complementation in *Candida glycerinogenes*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, 27: 1005–1008
- 77 Zhang C, Zong H, Zhuge B, et al. Production of xylitol from D-xylose by overexpression of xylose reductase in osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes* WL2002-5. *Appl Biochem Biotechnol*, 2002, 176: 1511–1527
- 78 Ji H, Lu X, Zong H, et al. A synthetic hybrid promoter for D-xylonate production at low pH in the tolerant yeast *Candida glycerinogenes*. *Bioengineered*, 2017, 8: 700–706

Advances in the HOG pathway of *Candida glycerinogenes*

LU XinYao, ZHUGE Bin, ZONG Hong & JI Hao

Research Center of Industrial Microbiology, Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214144, China

Candida glycerinogenes has been applied in the bioproduction of glycerol at industrial scale. It is an excellent industrial host with high tolerance to multistress, rapid cell growth, and glucose consumption. High osmolarity glycerol pathway (HOG) is a key regulatory mechanism in the stress response of eukaryotic cell. In this review, we summarize the components of HOG pathway and the effects of protein HOG1 on cell phenotype and the transportation and synthesis of glycerol and amino acids in *C. glycerinogenes* to further understand its HOG pathway and stress tolerance mechanism.

***Candida glycerinogenes*, stress response by HOG pathway, regulation**

doi: [10.1360/N052018-00258](https://doi.org/10.1360/N052018-00258)