

# 酿酒酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶的两个同工酶

刘桂香 余秉琦 诸葛斌 诸葛健

(江南大学教育部微生物重点实验室 无锡 214036)

**摘要:** 酿酒酵母细胞中的  $\text{NAD}^+$  依赖性胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶是甘油代谢途径中的关键酶之一, 催化磷酸二羟丙酮生成 3-磷酸甘油, 它有两个同工酶。深入研究它们的结构, 编码基因的表达调控以及它们在细胞中的作用的异同, 有助于进一步了解酵母细胞对高渗和缺氧环境做出应答的机理。本文对酿酒酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶的两个同工酶的上述 3 方面进行了综述。

**关键词:** 酿酒酵母, 胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶, 同工酶

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0106-05

## THE TWO ISOENZYMES OF *S. CEREVISIAE* GLYCEROL 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE

LIU Gui-Xiang YU Bing-Qi ZHUGE Bin ZHUGE Jian

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

**Abstract:**  $\text{NAD}^+$ -dependent cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* is one of the key enzymes in metabolic pathway of glycerol, catalysing the reduction of dihydroxyacetone phosphate to glycerol-3-phosphate. It has two isoenzymes. To study the differences between their structures, their expression of encoding genes and their functions may help increase the understanding of the cell response mechanism to the hyperosmotic and anoxic conditions. In this paper the research on the two isoenzymes was reviewed.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*, Cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase, Isoenzyme

收稿日期: 2002-09-10, 修回日期: 2002-11-11

3-磷酸甘油脱氢酶广泛存在于动物、植物和微生物的细胞中。酿酒酵母细胞中的3-磷酸甘油脱氢酶有两种：一类存在于线粒体中(GUT, EC 1.1.99.5),以 $FAD^+$ 为辅酶,在甘油的分解代谢途径中催化3-磷酸甘油生成磷酸二羟丙酮<sup>[1]</sup>。另一类存在于胞浆中(GPD, EC 1.1.1.8),以 $NAD^+$ 为辅酶,催化磷酸二羟丙酮生成3-磷酸甘油,是甘油合成途径的关键酶。该酶具有两个同工酶,即Gpd1p和Gpd2p,分别由GPD1和GPD2基因编码。当环境渗透压升高时,酵母细胞将合成并在胞内累积甘油以便维持细胞内外渗透压的平衡;当在缺氧条件下生长时,酵母细胞将合成并在胞内累积甘油以便维持细胞的氧化还原平衡。<sup>[2,3]</sup>有关酵母细胞内甘油的合成与累积的机理受到了广泛深入的研究。一方面,对酵母细胞是如何感知环境的变化并将信号传递至胞内从而合成和累积甘油这一现象的研究,有助于人们对真核细胞的信号转导的了解;另一方面,该研究结果将为采用基因工程的手段提高甘油的合成提供理论依据。

## 1 Gpd1p 和 Gpd2p 的结构

*S. cerevisiae* 的Gpd1p由391个氨基酸组成,分子质量42,869kD。它的氨基酸序列存在两个功能区域:  $NAD^+$ 结合区域和催化区域(Atto等,1980)。Rose等以渗透压敏感甘油缺陷突变株*osg1-1*为宿主细胞,并利用构建在穿梭载体YCp50上的酿酒细胞基因组文库对其进行转化,最终成功克隆到Gpd1p的编码基因GPD1并对其进行了序列分析。根据*S. cerevisiae*的GPD1基因的核苷酸序列推导出相应的氨基酸序列,并与兔子的3-磷酸甘油脱氢酶的氨基酸序列进行了比较,发现该酶的第1至第127个氨基酸残基与该酶 $NAD^+$ 结合功能有关。进一步研究表明,在第42至47个氨基酸残基部位,还存在该类酶都具有的普遍保守的Gly-x-Gly-x-x-Gly结构域("x"代表任意氨基酸),该结构域与AMP的连接有关。通过序列比较,发现氨基酸残基Pro-107与His-132也是酶功能所必需的。Sleep等(1991)将提取纯化的酿酒酵母Gpd1p酶的氨基酸序列与由GPD1基因核苷酸序列推导出的Gpd1p酶的氨基酸序列进行比较,发现由GPD1基因直接转录翻译产生的蛋白质氨基酸序列N-端与相应的酶比较,多出29个氨基酸残基。该N端片段在酶蛋白变成有活性的酶的过程中被切除<sup>[4]</sup>。

有关另一同工酶Gpd2p的研究相对较少,它由440个氨基酸组成,分子量49,421kD,与Gpd1p在氨基酸序列上具有69%的同源性。Eriksson P及André L等人从*S. cerevisiae*成功克隆到Gpd2p的编码基因GPD2并对其进行了研究。发现GPD2编码384个氨基酸,同Gpd1p一样,具有一个未知功能的氨基末端延伸区<sup>[5]</sup>。该两同工酶通常以二聚体形式存在<sup>[6]</sup>。

## 2 GPD1 和 GPD2 基因的诱导表达

### 2.1 GPD1 在高渗条件下的诱导表达

GPD1的表达受高渗胁迫的诱导,Edgley和Brown实验中首次发现,在高渗诱导下,GPD1的转录水平提高,Gpd1p酶量增大,导致酵母中代谢流指向甘油生成方向,而酒精合成减少<sup>[6]</sup>。Blomberg和Adler以及André等进一步验证了该类现象的存在<sup>[7,8]</sup>。

当把*S. cerevisiae*转到含有0.7mol/L浓度NaCl的培养基中培养60min后,其胞浆Gpd1p酶活可提高6倍<sup>[4]</sup>;把*S. cerevisiae*转到1.7mol/L浓度的NaCl的培养基中培养时,胞浆Gpd1p的酶活甚至增加30倍<sup>[5]</sup>;Nevoigt等进行高渗诱导时,发现超表达GPD1的

菌株的 Gpd1p 酶活可以比野生菌株高 20 倍, 此时其甘油产量是野生菌株的 6.5 倍<sup>[9]</sup>。然而, 虽然超表达 *GPD1* 可以使甘油的产量提高, 但同时会造成一些副产物的累积增加, 如丙酮、醋酸、3-羟基丁酮和琥珀酸<sup>[10,11]</sup>。超表达 Gpd1p 的同工酶 Gpd2p 也能达到同样的效果<sup>[3]</sup>。该研究发现对采用微生物法生产甘油起到启发作用, 增强产甘油生产菌株 *GPD1* 等有关基因的表达, 能够大幅度提高甘油的生成速度及产量。

在 *S. cerevisiae* 中, *GPD1* 的高渗胁迫作用主要通过一特定途径——高渗甘油应答途径 (the high osmolarity glycerol response pathway, HOG 途径) 来完成。当环境渗透压升高时, 作为 HOG 途径的重要的靶基因, *GPD1* 的 mRNA 转录水平提高。这一反应分 4 个不同的阶段: 滞后期、初始诱导期、反馈期、持续诱导期。而且它们的发生时间、转录水平的高低决定于溶液的浓度, 而与所用溶质种类无关。滞后期随着溶液浓度的升高而延长, *hog1*  $\Delta$  菌株中的滞后期更长。*S. cerevisiae* 中初始诱导期的发生与长短与 HOG 途径的活性密切相关, 它的发生和 Hog1p 的磷酸化一致, 快速而短暂。*hog1*  $\Delta$  菌株初诱导期中 *GPD1* 的 mRNA 最高水平仅仅是野生型的 15% ~ 20%, 并且该诱导被延迟。然而, 这种延迟对 *GPD1* 在不同的水活度 0.980<sub>aw</sub> 和 0.970<sub>aw</sub> 的环境中的诱导表达具有不同的效果, 其相应表达量的提高分别达到 6 ~ 10 倍和 15 ~ 20 倍。这种现象反映了在酵母 *GPD1* 的诱导过程中除了 HOG 途径以外, 还存在一重要的独立于 HOG 途径的组分, 该组分使得高渗环境中 *hog1*  $\Delta$  菌株 *GPD1* 水平的持续增长, 甚至几乎可以达到野生型的一半。初始诱导期过后, 进入反馈期, 此时 *GPD1* 的 mRNA 的水平重新迅速降低到几乎同诱导前一样, 该现象可在 0.980 <sub>aw</sub> 的细胞培养基中得到很好的观察, 它几乎与初始诱导期同步发生, 大约 30min。关于反馈机制的分子机理还未知。*hog1*  $\Delta$  菌株也存在反馈期, 这说明反馈期的发生至少部分独立于 HOG 途径。最后进入持续诱导期, *GPD1* 的 mRNA 的水平缓慢增长到一个更高的水平<sup>[12]</sup>。高渗环境对甘油合成途径关键酶的诱导过程如图 1<sup>[13-15]</sup>。

**2.2 *GPD2* 在缺氧条件下的诱导表达** *GPD2* 的表达不受环境渗透压变化的诱导, 而是受缺氧条件的诱导, 该诱导不依赖于 HOG 途径, 也不受对氧/压力敏感的调节基因如 *ROX1* 和 *ROX3* 的控制。另外, *GPD2* 在有氧条件下也可以通过添加亚硫酸氢盐引起细胞体内 NADH 的累积而被诱导表达。缺氧对 *GPD2* 的 mRNA 水平的起始诱导很高, 2h 后达到 9 倍。不过该高诱导水平是暂时的, 3 ~ 5h 后, 转移到缺氧条件下的培养物开始生长, *GPD2* 的 mRNA 水平下降到有氧培养下的 2 ~ 3 倍左右。然而缺氧条件下, *gpd1*  $\Delta$  菌株所表现的野生型的表型特征不发生变化, *GPD1* 的转录水平不受影响<sup>[3]</sup>。

*GPD1* 和 *GPD2* 分别受高渗和缺氧诱导的事实进一步被 Ricky 等人的实验证明。他们在实验中发现, *gpd2*  $\Delta$  突变株通常不能够在低渗和缺氧环境下生长, 但是却能够在高渗 (比如 0.7mol/L NaCl) 的培养基中生长。这表明通过高渗诱导 *GPD1*, 使 *GPD1* 表达量增大, 使得磷酸二羟丙酮还原为 3-磷酸甘油, 缓解了 *gpd2*  $\Delta$  菌株所受到的还原抑制作用; 相反, 正常情况下, *gpd1*  $\Delta$  突变株在含 0.1mol/L NaCl 的培养基中不能生长, 当把该菌株在无氧条件下培养时, 发现它能从含 0.1MNaCl 的培养基中长出。这说明缺氧对于 *GPD2* 的诱导, 缓解了 *gpd1*  $\Delta$  突变株的高渗敏感。同样, 对 *gpd1*  $\Delta$  *gpd2*  $\Delta$  双缺陷型菌株, 超表达 *GPD1* 或 *GPD2* 基因, 都会使该双缺陷型在缺氧或高盐条件下生长。因此, *GPD1* 和 *GPD2* 编码的酶在一定培养条件可以相互代替<sup>[3]</sup>。

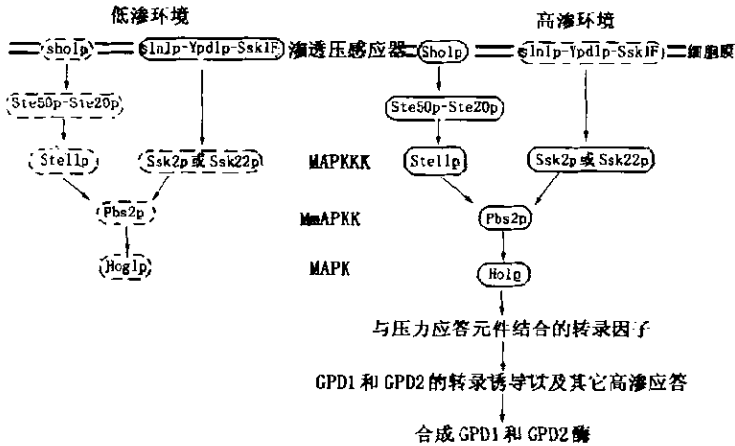


图 1 高渗环境对甘油合成途径关键酶基因的诱导

虚线框表示在该环境下该蛋白失活，实线框表示在该环境下该蛋白有活性；Sholp 起正调节作用，Sln1p-Tpd1p-Ssk1p 起负调节作用；实线箭头表示信号被传导，虚线箭头表示信号不被传导；MAPKKK 即 MAPKK 激酶，MAPKK 即 MAPK 激酶，MAPK 即促有丝分裂原活化蛋白激酶

### 3 Gpd1p 和 Gpd2p 的生理功能

随着环境渗透压的升高，酵母细胞内的水份将流向环境，同时一些浓度过高则对细胞有害的溶质像  $N^+$  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，甚至死亡。细胞通常对策是提高胞内一种或多种相容性溶质的累积。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，甘油是包括酿酒酵母在内的多种酵母细胞的最主要的相容性溶质。Gpd1p 不仅是酵母细胞内甘油合成代谢途径中的关键酶，而且受高渗诱导表达，因此在维持细胞内外渗透压平衡的过程中发挥了关键性作用。

细胞内的氧化还原平衡则是维持细胞正常代谢的另一重要因数。在有氧条件下，酵母细胞存在几种不同的还原调节机制，比如 3-磷酸甘油穿梭作用。然而 *S. cerevisiae* 在缺氧条件下维持该平衡的唯一途径是生成甘油。缺氧条件下野生型酿酒酵母细胞中，Gpd2p 被诱导过量合成，甘油合成速度加快，有效地氧化细胞代谢过程中因其他还原调节机制的缺乏而产生的过量 NADH；相反 *gpd2*Δ 菌株生长缓慢。这种生长抑制伴随着细胞内 NADH 的严重累积。这种因为缺氧造成的生长抑制也可以通过添加 NADH 氧化剂，比如乙醛、3-羟基丁酮来缓解；另外，GPD2 在有氧条件下可以通过在培养基中添加重亚硫酸盐而被诱导，在此重亚硫酸盐抑制酒精发酵过程最后一步还原反应使 NADH 积累。

### 4 讨论

同源基因 GPD1 和 GPD2 编码酿酒酵母甘油代谢途径中的同一种酶——胞浆  $NAD^+$  依赖性 3-磷酸甘油脱氢酶的两个同工酶 Gpd1p 和 Gpd2p，它们在酵母细胞代谢过程中具有不同的生理学功能。GPD1 的表达受高渗诱导，该诱导作用主要通过 HOG 途径实现。

GPD2 受缺氧条件的诱导, 对维持缺氧条件下细胞内氧化还原平衡具有重要作用。两种酶氨基酸序列具有高度的同源性, 并且对底物具有相似的亲和性, 另外, 运用合适的诱导条件诱导产生其中一种酶可以消除另一种同工酶的缺失造成的相应的细胞生长抑制。因此, 只要在足够高的水平上超表达其中一种同工酶, 都可以取代另一种酶在酵母中的作用。事实上, 到目前为止还没有证据表明这两种同工酶存在功能上的差异。

随着微生物发酵法生产甘油日益受到重视, 利用基因工程手段对甘油生产菌种进行改良已势在必行。最近新的研究表明, 增强酵母细胞中甘油的合成最直接的途径是高表达 GPD1 基因。因此, 对酵母细胞 3-磷酸甘油脱氢酶编码基因的表达调控做进一步的深入研究, 可为酵母甘油代谢工程提供必要的理论依据。

### 参 考 文 献

- [1] Ronnow B, Kjielland-Brandt M C. *Yeast*, 1993, 9 (10): 1121 ~ 1130.
- [2] Remize F, Barnavon L, Dequin S. *Metab Eng*, 2001, 3 (4): 301 ~ 312.
- [3] Ansell R, Granath K, Hohmann S, *et al.* *EMBO J*, 1997, 16 (9): 2179 ~ 2187.
- [4] Larsson K, Ansed R, Eriksson P, *et al.* *Mol Microbiol*, 1993, 10: 1101 ~ 1111.
- [5] Bentley P, Dickinson F M, Jones I. G *Biochem J*, 1973, 135: 853 ~ 859.
- [6] Edgley M, Brown A D. *J Gen Microbiol*, 1983, 129: 3453 ~ 3464.
- [7] Blomberg A, Adler L. *J Bacteriol*, 1989, 171: 1087 ~ 1092.
- [8] André L, Hemming A, Adler L. *FERS Lett*, 1991, 286: 13 ~ 17.
- [9] Nevoigt E, Stahl U. *Yeast*, 1996, 12: 1331 ~ 1337.
- [10] Michnick S, Roustan I L, Remize F, *et al.* *Yeast*, 1997, 13: 783 ~ 792.
- [11] Remize F, Roustan J L, Sablayrolles J, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65 (1): 143 ~ 149.
- [12] Martija R, Jacobus A, Johan M, *et al.* *Microbiology*, 1999, 145 (3): 715 ~ 727.
- [13] Posas F, Saito H. *Science*, 1997, 276: 1702 ~ 1705.
- [14] Posas F, Wungler-Murphy S M, Maeda T. *Cell*, 1996, 86: 865 ~ 875.
- [15] Posas F, Saito H. *EMBO J*, 1998, 17: 1385 ~ 1394.