

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2020.06.037

酿酒酵母细胞壁和细胞膜应对高渗胁迫机制研究

郭红¹ 邱月² 魏建平² 张宇翔² 袁亚宏² 岳田利^{1,2}

(1. 西北大学食品科学与工程学院, 西安 710069; 2. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 酿酒酵母是食品发酵最常用的菌种之一,酵母应对高渗胁迫的能力决定食品发酵的成功与否以及食品腐败的危害程度。为研究高糖压力对酿酒酵母的影响,测定了酿酒酵母在应对极端高糖压力(0.6 g/mL)时细胞壁几丁质和葡聚糖含量的变化,采用CFW染料和葡聚糖特异性降解酶对细胞壁的敏感性进行分析,并进一步通过双染料(PI和Hoechst 33342)染色对酿酒酵母细胞膜完整性进行分析,最后通过RNA测序研究了酿酒酵母在极端高糖压力下表达的全局差异基因。结果表明:高糖压力改变了酿酒酵母细胞壁和细胞膜的特性。全局转录测试结果显示,高糖压力通过下调酿酒酵母与细胞壁完整性(CWI)信号传导途径相关的基因ROM1、RLM1、PIR3、YGP1、CWP1等,进行细胞壁损伤的应激反应,高糖压力还通过下调酿酒酵母与细胞膜成分相关的基因(如PDR15和YOR1)造成了细胞膜损伤。最后,比较了酿酒酵母在不同压力因子(0.2 g/mL糖、0.4 g/mL糖、0.6 g/mL糖和柠檬醛压力)下细胞依赖RLM1调控的CWI信号传导途径的差异调节,结果发现,在CWI中起关键作用的RLM1仅在0.6 g/mL糖的极端压力下被下调。

关键词: 酿酒酵母; 细胞膜; 高糖压力; RNA测序; CWI信号传导途径

中图分类号: TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2020)06-0346-07 OSID: 

Hyperosmotic Stress Response of *Saccharomyces cerevisiae*
Cell Wall and Cell Membrane

GUO Hong¹ QIU Yue² WEI Jianping² ZHANG Yuxiang² YUAN Yahong² YUE Tianli^{1,2}

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China

2. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: To better understand the physiological and molecular response of *S. cerevisiae* to hyperosmotic stress, chitin and glucan contents in the cell wall and sensitivity of the cell wall to calcofluor white (CFW) stain and cell wall-degrading enzymes were assayed. Further analysis of the cell membrane integrity of *S. cerevisiae* was performed by staining with dual dyes (PI and Hoechst 33342). Finally, gene expression profiles of *S. cerevisiae* under extreme high glucose pressure were conducted by RNA sequencing (RNA-seq). The alterations in membrane integrity and wall integrity in *S. cerevisiae* were found after high sugar stress. Hyperosmotic stress-treated cells increased sensitivity to CFW stain and cell wall-degrading enzymes demonstrated that hyperosmotic stress disrupted cell wall properties. It was also found that hyperosmotic stress-treated cells increased sensitivity to PI stain, indicating that the membrane was damaged. Global transcript measurements confirmed the membrane damage observations by showing down-regulation of membrane components and changes in fatty acid biosynthesis. High sugar stress did cause a compensatory response to cell wall damage through downregulation of several genes (ROM1, RLM1, PIR3, YGP1 and CWP1) involved with the cell wall integrity (CWI) signaling pathway. In addition, the previous studies were combined to discuss the CWI signaling pathway of yeast response to different stresses. The research results provided a reference for understanding hyperosmotic stress mechanism.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; cell membrane; hyperosmotic stress; RNA sequencing; cell wall integrity signaling pathway

收稿日期: 2020-02-10 修回日期: 2020-03-27

基金项目: 港澳台科技合作专项(2015DFT30130)和国家自然科学基金项目(31671866)

作者简介: 郭红(1989—),女,讲师,博士,主要从事食品中耐高渗酵母检测及耐渗机理研究,E-mail: ghong0811@163.com

通信作者: 岳田利(1965—),男,教授,博士生导师,主要从事农产品加工与食品安全控制研究,E-mail: yuetl421@nwu.edu.cn

0 引言

细胞暴露于非理想的生长条件及任何降低细胞活力或适应性的环境都可以被认为是压力^[1]。高渗压力是一大类主要的非生物压力^[2]。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是一种温和耐渗酵母, 已成为研究渗透压耐受性的模型菌株。目前, 对于酿酒酵母耐渗机理的研究主要集中在高渗透性甘油促分裂原活化蛋白激酶 (High-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase, HOG-MAPK) 途径^[2-4], 通过甘油的产生调节渗透压平衡^[5-6]。HOG-MAPK 途径中的细胞膜传感器感知压力信号, 将压力信号传输至 Hog1 激酶, Hog1 磷酸化 (Hog1-PP) 后进入细胞核, 进而调节转录反应^[4]。在 0.2 g/mL 糖胁迫下的转录反应表明, 酿酒酵母诱导了与压力反应途径、修复途径和 HOG 途径有关的基因^[7]。在 0.4 g/mL 糖压力下, 酿酒酵母增加了糖酵解和戊糖途径等相关基因的表达^[8]。在 0.6 g/mL 的糖胁迫下, 酿酒酵母诱导了半胱氨酸蛋白酶和线粒体依赖性凋亡^[9], 但是在此条件下, 酿酒酵母细胞壁(膜)的变化与分子机制尚不清楚。此外, 酿酒酵母还是一种可揭示与高渗压力变化有关的病理特征(例如缺血和糖尿病昏迷)的模型菌株^[4,9], 高渗应激也能诱导人细胞系凋亡^[10]。

细胞壁是细胞在压力下存活所必需的。在高渗压力下, 一方面, 酵母转向更低渗透压环境会增加细胞体积, 从而破坏细胞膜的完整性, 为了抵消这种压力, 酵母细胞壁具有保护细胞膜免于被爆裂的作用。另一方面, 高渗透压会导致酵母细胞内的水流出和细胞收缩, 且会造成多种细胞生物过程的破坏, 例如破坏细胞骨架结构、触发细胞周期停滞和凋亡^[6]。然而, 酿酒酵母细胞表面响应在极端高糖压力的应对机制尚不清楚。为此, 本文比较研究酿酒酵母细胞壁(膜)在高糖压力下的变化, 并通过全局转录文件对其进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酿酒酵母 (ATCC38531) 购自美国典型培养物保藏中心 (ATCC); TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; 几丁质酶和 β -葡聚糖降解酶购自上海源叶公司; D-葡萄糖胺、4-二甲基氨基苯甲醛、磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH 值 7.2 ~ 7.4)、卡尔科弗卢尔荧光增白剂 (Calcofluor white stain, CFW)、碘化丙啶 (PI) 和赫斯特荧光燃料 33342 (Hoechst 33342) 购自美国 Sigma - Aldrich 公司; 酵母提取物、蛋白胨、D-(+)-

葡萄糖和多肽购自当地供应商。

1.2 细胞培养

酿酒酵母 ATCC38531 在 YPD (1% 酵母提取物、2% 蛋白胨和 2% 葡萄糖) 肉汤中 30℃ 培养, 直至培养物处于指数后期 (菌体浓度约 1×10^8 CFU/mL)。然后使用 YPD 培养基 (0.02 g/mL 葡萄糖) 作为基础和无应激培养基, 使用 60% YPD (0.6 g/mL 葡萄糖) 作为高糖培养基^[11]。取 20 mL 培养至指数后期的酿酒酵母 (菌体浓度约 2×10^9 CFU/mL) 接种到 60% YPD 培养基中, 至菌体浓度为 2×10^7 CFU/mL, 然后 30℃ 适应 4 h。将分别在 YPD 培养基和 60% YPD 培养基中适应 4 h 的酿酒酵母细胞洗涤并重悬于 PBS 中, 并作为对照组的样品和高渗胁迫处理组的样品。

1.3 细胞壁特性变化分析

1.3.1 细胞壁中几丁质和 β -葡聚糖含量测定

根据文献[12]报道的方法分离对照组和处理组酿酒酵母的细胞壁并定量测定细胞壁几丁质和 β -葡聚糖的含量。

1.3.2 细胞壁染色

根据文献[13]报道的方法进行酵母细胞的 CFW 染色试验。将 2 μ L CFW 染色的细胞上样到载玻片上, 在顶部添加盖玻片, 使用 Andor CSU - W 型共聚焦显微镜拍摄图像。

1.3.3 细胞壁酶解

根据文献[14]报道的方法, 选择葡聚糖特异性降解酶对对照组细胞和高浓度葡萄糖处理组的细胞进行细胞壁的降解试验, 从而对细胞壁的灵敏性进行分析。将对照组和高浓度葡萄糖处理组的细胞用超纯水洗涤, 分别在 NaH_2PO_4 (0.1 mol/L)、0.04% NaN_3 和 40 μ g/mL 降解酶的缓冲液中稀释至细胞在 660nm 处 OD 值为 0.73。每小时监测细胞浓度的变化并测定对照组和高浓度葡萄糖处理组的酵母细胞酶解后的 OD 值, 重复 3 次。

1.4 细胞膜的 PI 和 Hoechst 33342 双染试验

根据文献[15]报道的方法并做了一些改进, 进行酿酒酵母细胞膜完整性分析的双染试验。染色试验需要添加至少 0.1 μ g/ μ L PI 和 10 μ g/ μ L Hoechst 33342。细胞染色处理后在荧光显微镜 (德国 Lecia 公司) 下观察酵母细胞。

1.5 RNA 提取的样品制备

RNA 提取的样品为分别在 YPD 培养基和 60% YPD 培养基中适应 4 h 的酿酒酵母细胞, 即对照组的样品和高渗胁迫处理组的样品。每个样品重复 3 次, 收集所有样品, 随后用液氮快速冷冻并在 -80℃ 下储存, 用于 RNA 提取。

1.6 转录组分析

RNA 的提取准备、RNA 质量检测、cDNA 文库构建和 RNA 测序在北京诺禾公司进行。按照 TRIzol 试剂的说明书提取细胞总 RNA 并用无 RNase 的 DNA 酶 I 处理。使用 NanoDrop 型分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司)、Qubit 2.0 型荧光计(美国 Life Technologies 公司)、琼脂糖凝胶电泳和 Agilent 2100 型生物分析仪(美国 Agilent Technologies 公司)测定 RNA 样品的浓度、纯度和完整性^[11,16]。根据文献[17-18]构建 cDNA 文库,并在 Illumina Hiseq 2000 平台(美国 San Diego 公司)上测序。

1.7 差异表达基因鉴定

从对照组和处理组样品中测序并产生原始读数。通过过滤衔接子序列获得高质量的 RNA-Seq 纯净序列读数。通过 HISAT 2.0 将酿酒酵母的纯净序列读数与酿酒酵母 S288C 的参考基因组比对。通过 HTSeq v0.6.1 量化基因表达值。DESeq v1.10.1 用于确定对照组和处理组样品之间的差异表达基因(DEG)。如果基因变化倍数以 2 为底的对数值大于 0 且显著性 $p < 0.05$,则认为基因显著差异表达。根据文献[11],通过 GOSeq Release 2.12

进行 DEG 的 GO 富集分析。本试验测定的 RNA-seq 数据已经存入国家生物技术信息中心,登录号为 PRJNA437612。

2 结果及分析

2.1 极端高糖压力对酿酒酵母细胞壁的影响

为探索酿酒酵母在极端高糖条件下细胞壁特性的变化,测定了对照组和高糖压力处理组酿酒酵母细胞壁中几丁质和葡聚糖的含量。如图 1a 所示,酿酒酵母细胞壁在高糖压力下适应 4h 后几丁质含量(质量比,以每毫克干细胞壁质量计)从 6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 增加到 6.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$,葡聚糖含量从 128 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 增加到 138 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。如图 1b、1c 所示,相比对照组细胞,处理组的酿酒酵母细胞对 CFW 染料的结合显示出高灵敏性,并且 CFW 染色的高灵敏性主要富集在芽颈的区域。此外,如图 1d 所示,处理组的细胞在降解酶处理 3 h 后细胞浓度(660 nm 处 OD 值)有 49% 的下降,而对照组仅有 25% 的下降,这说明了经过高糖压力处理的酿酒酵母的细胞壁更易受到葡聚糖特异性降解酶的降解。以上的现象可能是因为酿酒酵母在高糖压力下细胞壁葡聚糖-几丁质层遭到了损伤或者破坏。

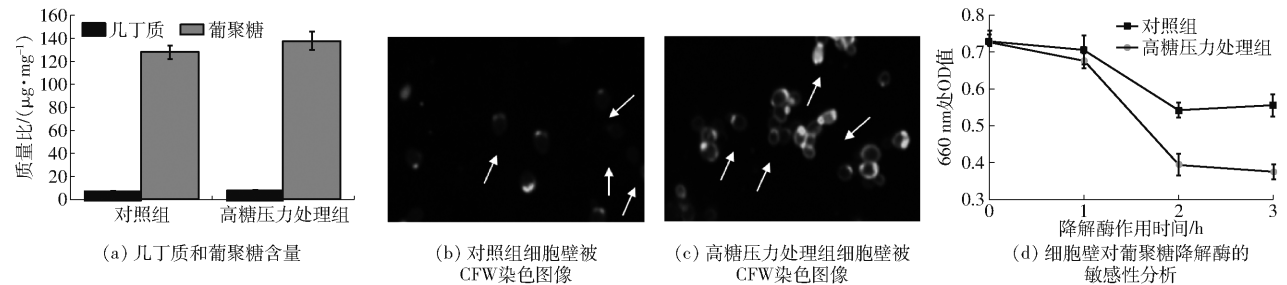


图1 高渗胁迫对酿酒酵母细胞壁特性的影响

Fig.1 Effects of high sugar stress on cell wall properties

2.2 极端高糖压力对酿酒酵母细胞膜的影响

为研究极端高糖压力对酿酒酵母细胞膜的影响,进行双染试验来区分细胞膜完整的细胞和细胞膜损伤的细胞^[13,15]。PI 染料不可渗入具有完整细胞膜的细胞,但它可以容易地渗入到细胞膜受损的细胞中并使该细胞染色,而留下具有完整细胞膜的细胞未被染色。而细胞膜完整和细胞膜受损的细胞都可以被细胞穿透性染料 Hoechst 33342 染色。荧光图像结果显示,经过 0.6 g/mL 高糖压力分别处理 4 h 和 8 h 的部分细胞能被 PI 染料染成红色而对照组的细胞未被 PI 染料染色,这说明高浓度葡萄糖处理的细胞细胞膜受到了损伤(图 2),而对照组细胞的细胞膜未受到损伤。

2.3 酿酒酵母细胞的 RNA 测序结果

为解释以上发现,对对照组细胞和处理组细

胞进行了全局的 RNA-seq 测序。差异基因火山图如图 3 所示,有显著性差异表达的基因用红色点(上调)和绿色点(下调)表示,无显著性差异表达的基因用蓝色点表示。本试验中鉴定出酿酒酵母在适应 0.6 g/mL 极端高糖压力下上调表达的 1 959 个和下调表达的 1 955 个基因(DEGs)(图 3)。这个基因数量要显著多于酿酒酵母在应对 0.2 g/mL 糖质量浓度下获得的 294 个差异基因^[7]和酿酒酵母在应对 0.4 g/mL 糖质量浓度条件下获得的 589 个差异基因^[8]。由此可以看出,酿酒酵母随着环境糖浓度的增加,差异表达的基因也增加。这可能是因为随着环境压力的增加,细胞应对环境压力的调节机制变得更复杂。为此,本文着重关注与表型结果相关的细胞膜和细胞壁的 DEGs。

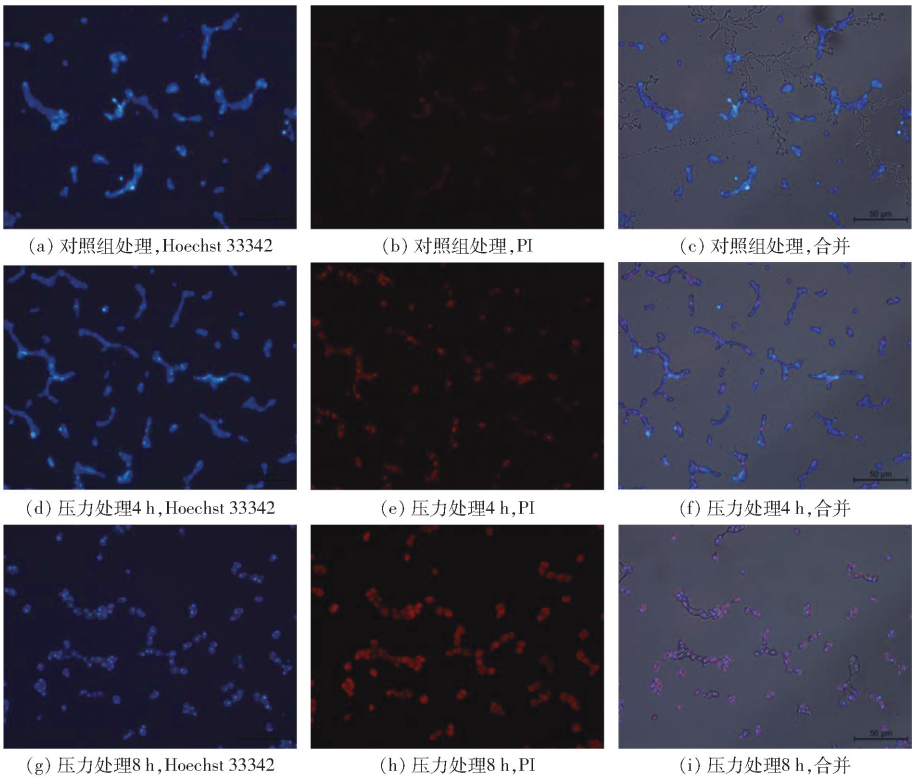


图2 高渗胁迫对酿酒酵母细胞膜完整性的影响

Fig. 2 Effects of high sugar stress on integrity of cell membrane

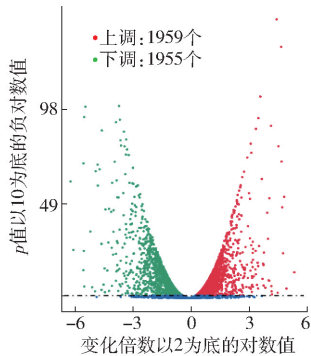


图3 差异基因火山图

Fig. 3 Volcano diagram of DEGs

2.4 极端高糖压力对酿酒酵母细胞膜代谢途径的影响

本研究观察到与细胞膜相关的脂肪酸/不饱和脂肪酸合成、脂肪酸代谢、脂肪酸降解、脂肪酸延长等途径在极端高糖压力下均发生了显著变化(表1、图2)。这说明 0.6 g/mL 高糖压力可能通过干预脂肪酸的组成和含量来影响膜的流动性或渗透性。文献[19]表明脂肪酸通过改变膜的流动性或渗透性来参与对外部应激的反应。

2.5 极端高糖压力对酿酒酵母细胞壁完整性(CWI)信号传导途径的影响

极端高糖压力诱导了酿酒酵母一系列与细胞壁组成和生物发生相关的基因的差异表达(表2)。细胞壁完整性(CWI)信号通路相关基因显著的差异表

表1 与细胞膜相关的差异表达基因

Tab. 1 Differentially expressed genes associated with plasma membrane compartments and functions	
代谢途径/功能	主要基因(差异表达倍数,“-”代表下调)
脂肪酸合成	FAA1(-3.5)、FAA2(-2.8)、FAS2(4.9)、FAA4(3.9)、FAS1(2.7)、FAA3(2.5)、ACC1(1.8)
不饱和脂肪酸合成	POX1(-4.0)、OLE1(-2.2)、TES1(-1.6)、LAP2(-1.5)、ELO3(3.7)、ELO2(3.0)、ELO1(2.9)、IFA38(1.4)
脂肪酸代谢	POT1(-9.5)、POX1(-4.0)、FAA1(-3.5)、FAA2(-2.8)、OLE1(-2.2)、FAS2(4.9)、ETR1(4.5)、FAA4(3.9)、ELO3(3.7)、ELO2(3.0)、ELO1(2.9)、FAS1(2.7)、FAA3(2.5)、CEM1(1.8)、HFA1(1.8)、ACC1(1.8)、IFA38(1.4)、ERG10(1.4)
脂肪酸降解	POT1(-9.5)、FAA1(-3.5)、FAA2(-2.8)、DIT2(-2.7)、FAA4(3.9)、FAA3(2.5)、SFA1(2.1)、ERG10(1.4)
脂肪酸延长	TES1(-1.5)、ELO2(3.0)、ELO1(2.9)
碳水化合物、异源蛋白、氨基酸等转运蛋白	PXA2(-3.2)、YOR1(-2.8)、TBS1(-2.7)、PXA1(-2.2)、STE6(-2.1)、PDR15(-2.0)、PDR10(-2.0)、RPA34(2.0)、ATM1(1.7)、HUT1(1.6)
固醇合成	ARE2(-2.8)、TGL4(-1.9)、STE1(-1.5)、ARE1(2.8)、ERG3(2.7)、ERG1(2.1)、ERG4(1.6)、ERG2(1.5)

达进一步支持了从图1中观察到的细胞壁变化。酿酒酵母在高糖压力下与细胞壁有关的一些关键信号

表 2 与细胞壁相关的差异表达基因

Tab.2 Differentially expressed genes associated with cell wall compartments and functions	
代谢途径/功能	主要基因(差异表达倍数,“-”代表下调)
细胞壁完整性	<i>PIR3</i> (-12.6)、 <i>YGP1</i> (-5.8)、 <i>FIT2</i> (-4.5)、 <i>ROM1</i> (-3.3)、 <i>CWP1</i> (-2.9)、 <i>SPS100</i> (-2.4)、 <i>RLM1</i> (-1.8)、 <i>PIR1</i> (-1.7)、 <i>PRM5</i> (4.6)、 <i>PGK1</i> (2.7)、 <i>CIS3</i> (2.5)、 <i>MLP1</i> (1.4)、 <i>PST1</i> (1.3)、 <i>CRH1</i> (1.3)
	<i>HSP12</i> (-70.0)、 <i>YHR097C</i> (-3.9)、 <i>FBP26</i> (-2.8)、 <i>SRL3</i> (-1.4)、 <i>SLT2</i> (2.0)、 <i>GFA1</i> (1.8)、 <i>YPL088W</i> (1.7)
细胞壁组织	

基因(*ROM1*、*PIR3*、*YGP1* 和 *CWP1*)和主要转录因子 *RLM1* 被下调(表 2、图 4d)。此外,*RLM1* 的 22 个靶标基因中有 6 个基因过表达,有 6 个基因被抑制,这些靶标基因编码与细胞壁组织和细胞壁生物发生相关的蛋白质(图 4d)。

3 讨论

膜外排泵在假单胞菌耐渗过程中起关键作用。细菌外排泵(*AcrAB-TolC*)在大肠杆菌中的过表达导致其对环境压力的耐受性增加^[14]。与细菌泵系统类似,酵母细胞的排毒功能主要由多效药物抗药

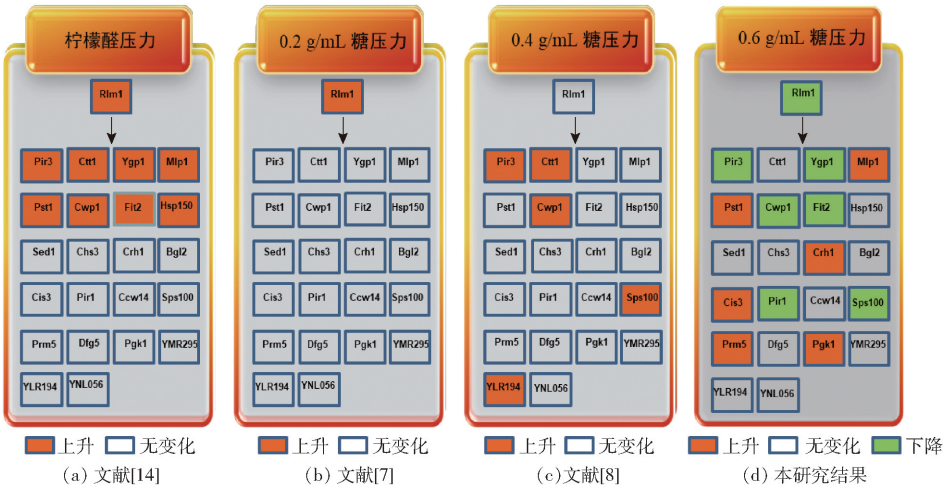


图 4 细胞壁完整性(CWI)信号通路在不同压力下的转录表达

Fig. 4 Cell wall integrity signaling pathway with transcriptomic expression changes during different stresses

性(PDR)泵驱动,PDR 泵是酵母细胞膜上 ABC 转运蛋白(ATP-binding cassette)的一个子家族^[20]。ABC 转运蛋白通过释放细胞有害分子来应对环境压力^[21]。在真菌扩展青霉中,ABC 转运蛋白基因的下调表达降低了耐药性^[18]。酿酒酵母的 ABC 转运蛋白基因(*YOR1* 和 *PDR15*)在高糖胁迫下分别下调表达了 2.8 倍和 2.0 倍(表 1),这表明本研究使用的极端高渗压力(0.6 g/mL 糖)可能降低了酿酒酵母的排毒功能。0.6 g/mL 高糖压力还影响了酿酒酵母细胞膜上碳水化合物、异源蛋白和氨基酸转运蛋白的活性(表 1),这个结果与柠檬醛压力对酿酒酵母细胞膜转运蛋白的影响类似^[14]。麦角固醇是真菌细胞膜的主要成分之一,它被认为对调节细胞的结构、渗透、生长和增殖至关重要^[18]。在本研究中,参与麦角固醇生物合成的大多数基因(*ERG1*~4)的表达水平被上调(表 1),这说明酿酒酵母在 0.6 g/mL 高糖压力下可能增加合成麦角固醇,这与文献[2]报道的鲁氏接合酵母通过上调麦角固醇合成的相关基因来应对高渗压力类似。麦角固醇与脂肪酸两者比例的变化已被报道影响细胞膜的流动性^[2],这也进一步说明 0.6 g/mL 高糖压力影响细胞膜流动性,

但是细胞膜流动性对细胞响应高渗压力的具体作用机制尚待进一步研究。此外,如图 5 所示,GO 分析前 30 条下调的 GO 分类,纵坐标表示 GO 术语,横坐标表示每个 GO 术语的差异基因数量,“*”显示显著性,观察到多达 393 个 DEGs 富集在膜组分 GO 分类上且均被下调(图 5),这些 DEGs 可能在膜上发挥功能。上述细胞膜基因的显著变化,结合试验中发现的脂肪酸、麦角固醇等成分的基因在高渗胁迫下的差异表达,支持了双染试验中发现的细胞膜损伤的现象(图 2)。

细胞壁对细胞存活至关重要^[14]。它的晶格结构通过纤维素和几丁质链之间强大的氢键网络以及 3 个壁成分(葡聚糖、甘露糖蛋白和几丁质)之间的共价糖苷键紧密地结合在一起。CFW 是一种荧光染料,通过与几丁质和多糖之间的氢键结合到细胞壁^[14],但是在真菌中,CFW 优先结合位于细胞壁发芽颈中的几丁质^[22]。在图 1b、1c 的细胞壁 CFW 染色试验中,每个处理组的细胞数量相同,但是有更多的 CFW 染料与处理组的细胞结合,说明高糖压力处理的酿酒酵母对 CFW 敏感性增加。文献[23-24]表明白色念珠菌、黑曲霉和许多其它真菌对 CFW 的

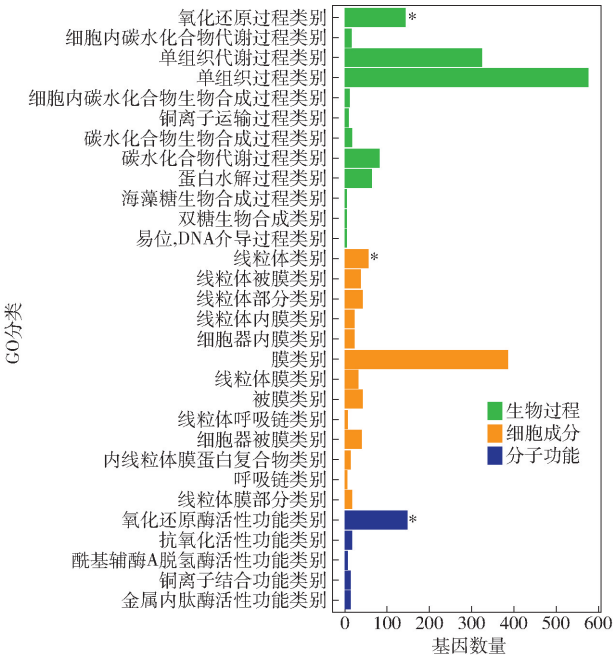


图 5 GO 功能分类分析下调的差异基因

Fig. 5 GO functional classification of down-regulated DEGs

敏感性增加表明细胞壁受损。以前的报道还表明几丁质聚合物的晶格结构破裂会削弱细胞壁,从而导致细胞停滞和几丁质在酿酒酵母细胞中的积累^[24],这种机制与结果中细胞几丁质含量增加(图 1a)和 CFW 敏感性增加(图 1c)的结果一致,而且与已报道的 0.6 g/mL 高糖压力抑制酿酒酵母生长的结果一致^[2,9]。此外,在用极端高糖压力处理酿酒酵母后,细胞壁对葡聚糖特异性裂解酶的降解更敏感,这表明酿酒酵母在极端高糖压力下可能发生了去结晶作用(图 1),推测酿酒酵母细胞壁相关的基因可通过调节细胞壁多糖-几丁质层^[25]的交联程度来应对高渗压力。

酿酒酵母在极端高糖压力下的转录结果进一步表明细胞壁正在承受压力。在这项研究中发现的 13 个差异表达基因 (*HSP12*、*CWP1*、*PIR3*、*CRH1*、*GFA1*、*PST1*、*SLT2*、*SRL3*、*MLP1*、*YPL0882*、*PRM5*、*YHR097C* 和 *FBP26*) 同属于文献[26]报道的一个包

含 20 个特征基因的基因簇,这 20 个特征基因代表了细胞壁正在承受压力的转录指纹图谱,其中有一些特征基因直接参与细胞壁完整性(CWI)信号通路(图 4d)。在极端高糖压力下,酿酒酵母抑制了细胞表面传递压力信号的鸟嘌呤核苷酸交换因子 *ROM1* (表 1),然后它下游的 *RLM1* 被抑制(表 1)。*RLM1* 的 6 个靶标基因 (*PIR1*、*CWP1*、*PIR3*、*SPS100*、*FIT2* 和 *YGP1*) 下调表达,特别是细胞壁组织和稳定性所必需的 *PIR3* 和 *YGP1* 分别下调了 12.6 倍和 5.8 倍(图 4d 和表 2)。研究表明 *RLM1* 是编码负责输出 CWI 大部分转录基因的关键转录因子^[21]。图 4 还显示了酿酒酵母依赖 *RLM1* 调节的 CWI 信号传导途径在不同压力因子下的差异调节。酿酒酵母在 0.6 g/mL 高糖压力下生长受到抑制甚至开始凋亡^[2,9],在试验中(0.6 g/mL 糖压力下) *RLM1* 转录因子下调表达,同时也造成由 *RLM1* 转录的靶标基因发生改变。酿酒酵母在 0.2 g/mL 和 0.4 g/mL 糖质量浓度下均生长良好,并没有发生 *RLM1* 转录因子的改变以及大多数由 *RLM1* 转录的靶标基因的改变^[7-8],这些结果说明了酿酒酵母在进一步的糖压力下 *RLM1* 被抑制并失去了维持细胞稳定的能力。

4 结束语

本研究测定了在 0.6 g/mL 极端高糖压力下酿酒酵母细胞壁组分的变化,采用染色试验和酶降解试验研究了细胞壁(膜)的结构变化,并通过全局转录文件对发现的表型结果进行分析讨论。结果表明,在 0.6 g/mL 极端高糖压力下,通过下调酿酒酵母与细胞壁完整性(CWI)信号传导途径、细胞膜成分相关的基因 (*ROM1*、*RLM1*、*PIR3*、*YGP1*、*CWP1*、*PDR15*、*YOR1* 等),进行细胞壁(膜)高渗损伤的应激反应,0.6 g/mL 极端高糖压力改变了酿酒酵母细胞壁特性和细胞膜流动性。本文为进一步研究酿酒酵母的高渗胁迫应对机制奠定了基础。

参 考 文 献

[1] DE NADAL E, AMMERER G, POSAS F. Controlling gene expression in response to stress [J]. Nature Reviews Genetics, 2011, 12:833 – 845.

[2] DAKAL T C, SOLIERI L, GIUDICI P. Adaptive response and tolerance to sugar and salt stress in the food yeast *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 185:140 – 157.

[3] KLIPP E, NORDLANDER B, KRÜGER R, et al. Integrative model of the response of yeast to osmotic shock [J]. Nature Biotechnology, 2005, 23:975 – 982.

[4] MITCHELL A, WEI P, LIM W A. Oscillatory stress stimulation uncovers an Achilles’ heel of the yeast MAPK signaling network [J]. Science, 2015, 350:1379 – 1383.

[5] GRANADOS A A, CRANE M M, MONTANO-GUTIERREZ L F, et al. Distributing tasks via multiple input pathways increases cellular survival in stress [J]. eLIFE, 2017, 6:E21415.

[6] MIERMONT A, WAHARTE F, HU S, et al. Severe osmotic compression triggers a slowdown of intracellular signaling, which

- can be explained by molecular crowding [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110:5725 – 5730.
- [7] JIMÉNEZ-MARTÍ E, ZUZUARREGUI A, GOMAR-ALBA M, et al. Molecular response of *Saccharomyces cerevisiae* wine and laboratory strains to high sugar stress conditions [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 145(1):211 – 220.
- [8] ERASMUS D J, VAN D M, GEORGE K, et al. Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress [J]. *FEMS Yeast Research*, 2003, 3(4):375 – 399.
- [9] SILVA R D, SOTOCÁ R, JOHANSSON B, et al. Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 58(3):824 – 834.
- [10] EDWARDS Y S, SUTHERLAND L M, POWER J H, et al. Osmotic stress induces both secretion and apoptosis in rat alveolar type II cells [J]. *American Journal of Physiology-gastrointestinal and Liver Physiology*, 1998, 275:670 – 678.
- [11] GUO H, NIU C, LIU B, et al. Protein abundance changes of *Zygosaccharomyces rouxii* in difference sugar concentrations [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 233:44 – 51.
- [12] FRANCOIS J M. A simple method for quantitative determination of polysaccharides in fungal cell walls [J]. *Nature Protocol*, 2006, 1(6):2995 – 3000.
- [13] BOONE C H T, GROVE R A, ADAMCOVA D, et al. Oxidative stress, metabolomics profiling, and mechanism of local anesthetic induced cell death in yeast [J]. *Redox Biology*, 2017, 12:139 – 149.
- [14] BRENNAN T C, KRÖMER J O, NIELSEN L K. Physiological and transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to d-limonene show changes to the cell wall but not to the plasma membrane [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79:3590 – 3600.
- [15] ZHENG K, SETYAWATI M I, LEONG D T, et al. Antimicrobial gold nanoclusters [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(7):6904 – 6910.
- [16] LIN J Q, ZHAO X X, ZHI Q Q, et al. Transcriptomic profiling of *Aspergillus flavus* in response to 5-azacytidine [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2013, 56:78 – 86.
- [17] LAI T, WANG Y, FAN Y, et al. The response of growth and patulin production of postharvest pathogen *Penicillium expansum* to exogenous potassium phosphite treatment [J]. *International Journal Food Microbiology*, 2017, 244:1 – 10.
- [18] WANG Y, FENG K, YANG H, et al. Effect of cinnamaldehyde and citral combination on transcriptional profile, growth, oxidative damage and patulin biosynthesis of *Penicillium expansum* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9:597.
- [19] SONG Z, NIU C, WU H, et al. Transcriptomic analysis of the molecular mechanisms underlying the antibacterial activity of IONPs@ pDA-Nisin composites toward *Alicyclobacillus acidoterrestris* [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11:21874 – 21886.
- [20] BAUER B E, WOLFGER H, KUCHLER K. Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance [J]. *Biochimica et Biophysica (BBA)—Reviews on Biomembranes*, 1999, 1461:217 – 236.
- [21] MARGALEF-CATALÀ M, ARAQUE I, BORDONS A, et al. Transcriptomic and proteomic analysis of *Oenococcus oeni* adaptation to wine stress conditions [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7:1554.
- [22] PRINGLE J R. Staining of bud scars and other cell wall chitin with calcofluor [J]. *Methods in Enzymology*, 1991, 194:732 – 735.
- [23] POPOLO L, VAI M. Defects in assembly of the extracellular matrix are, responsible for altered morphogenesis of, a *Candida albicans* phr1 mutant [J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(1):163.
- [24] ELORZA M V, RICO H, SENTANDREU R. Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells [J]. *Microbiology*, 1983, 129(5):1577 – 1582.
- [25] ENE I V, WALKER L A, SCHIAVONE M, et al. Cell wall remodeling enzymes modulate fungal cell wall elasticity and osmotic stress resistance [J]. *MBio*, 2015, 6:e00986.
- [26] GARCÍA R, BERMEJO C, GRAU C, et al. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(15):15183 – 15195.