

工业生物技术

乙醇胁迫抑制毕赤酵母表达外源蛋白的转录组学分析

高鹏, 丁健, 张许, 赵玥, 张猛, 高敏杰, 吴剑荣, 詹晓北

江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

高鹏, 丁健, 张许, 等. 乙醇胁迫抑制毕赤酵母表达外源蛋白的转录组学分析. 生物工程学报, 2016, 32(5): 584–598.

Gao P, Ding J, Zhang X, et al. Transcriptome analysis of *Pichia pastoris* in response to ethanol stress. Chin J Biotech, 2016, 32(5): 584–598.

摘要: 在 5 L 发酵罐中进行毕赤酵母发酵表达猪 α 干扰素的实验, 发现甘油培养末期乙醇的积累会抑制外源蛋白的表达。从转录组学角度系统分析不同浓度乙醇胁迫条件下, 毕赤酵母甘油培养期和甲醇诱导期细胞的生理状态变化。研究表明, 在甘油培养期, 乙醇胁迫使得毕赤酵母细胞中的 545 个基因发生了显著差异表达 (265 个基因表达上调, 280 个基因表达下调), 这些差异表达基因的功能主要涉及蛋白质合成、能量代谢、细胞周期和过氧化物酶代谢。乙醇胁迫增加了蛋白质错误折叠的情况, 降低了核糖体和线粒体的结构完整性, 使得甘油培养末期无法得到大量具有健全功能的酵母细胞。在甲醇诱导期, 与甲醇代谢、蛋白质加工合成、氨基酸代谢等途径相关的 294 个基因发生了显著差异表达 (171 个基因表达上调, 123 个基因表达下调), 导致内质网胁迫不能被及时解除, 破坏了细胞内的氨基酸正常代谢。

关键词: 毕赤酵母, 外源蛋白, 乙醇胁迫, 转录组学

Received: September 30, 2015; **Accepted:** December 21, 2015

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31301408), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20130122), China Postdoctoral Science Foundation (No. 2014M551501).

Corresponding authors: Jianrong Wu. Tel: +86-510-85197383; Fax: +86-510-85918299; E-mail: kinowu@jiangnan.edu.cn

Minjie Gao. Tel: +86-510-85197383; Fax: +86-510-85918299; E-mail: jmgao@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31301408), 江苏省自然科学基金 (No. BK20130122), 中国博士后科学基金 (No. 2014M551501) 资助。

网络出版时间: 2016-01-05

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20160105.1432.001.html>

Transcriptome analysis of *Pichia pastoris* in response to ethanol stress

Peng Gao, Jian Ding, Xu Zhang, Yue Zhao, Meng Zhang, Minjie Gao, Jianrong Wu, and Xiaobei Zhan

Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Effective expression of pIFN- α in recombinant *Pichia pastoris* was conducted in a 5 L fermentor. Ethanol accumulation during the late glycerol feeding period inhibited heterologous protein expression. Comparative transcriptome analysis was thus performed to compare the gene transcription profiles of *Pichia pastoris* KM71H in high and low ethanol concentration environments. The results showed that during the glycerol cultivation stage, 545 genes (265 up-regulated and 280 down-regulated) were differentially expressed with ethanol stress. These genes were mainly involved in protein synthesis, energy metabolism, cell cycle and peroxisome metabolism. During the methanol induction stage, 294 genes (171 up-regulated and 123 down-regulated) were differentially expressed, which were mainly related to methanol metabolism, amino acid metabolism and protein synthesis. Ethanol stress increased protein misfolding and reduced structural integrity of ribosome and mitochondria during cultivation stage, and led to the failure of endoplasmic reticulum stress removal and damaged amino acid metabolism during induction stage in *Pichia pastoris*.

Keywords: *Pichia pastoris*, heterologous protein, ethanol stress, transcriptome

甲醇营养型重组毕赤酵母 (Methylotrophic *Pichia pastoris*) 表达系统是 20 世纪 80 年代初开发和研制的一种新型酵母表达系统, 近年来已成为极受青睐、应用广泛的外源蛋白表达系统^[1]。毕赤酵母表达系统的广泛应用促使科学工作者对其生理状态、发酵特性和过程控制策略进行深入研究。目前通用的外源蛋白表达控制方法分成两个阶段: 1) 甘油流加培养获得高细胞密度; 2) 甲醇流加诱导外源蛋白表达。

近年来, 大量研究主要集中在第二阶段 (诱导期) 甲醇浓度、甲醇流加方式和外部环境条件 (温度、溶解氧、pH、渗透压等) 对细胞生理状态和外源蛋白表达的影响等方面^[2-4]。Zhu 等^[5]从转录水平分析了共混流加山梨醇和甲醇对外源蛋白表达的影响, 发现参与中心代谢的关键

基因和参与蛋白折叠的两个基因转录水平均有所提高, 而目的基因和参与甲醛异化途径的基因转录水平却显著下降。Baumann 等^[6]利用转录组学等方法研究了毕赤酵母适应低氧环境的分子机理, 发现胞内一些代谢途径的基因表达机制不仅容易受到低氧环境的影响, 而且对蛋白分泌也具有促进作用。目前有研究表明: 在第一阶段的甘油培养期, 如何大量获取功能健全的细胞体也是外源蛋白高效表达的关键因素^[7]。Wei 等^[8]采用指数流加的方式生产重组花鲈生长激素, 将细胞比生长速率从 0.05/h 提高到 0.16/h, 并结合混合流加诱导策略, 最终目的蛋白产量提高了 69%, 达到 0.59 mg/g。本课题组提出了一种 ANNPR-Ctrl 甘油流加控制策略, 将细胞浓度提高到了 120 g/L, 在甲醇单独诱导

条件下,最终外源蛋白猪 α 干扰素的浓度提高了50%,达到1.43 g/L^[7]。

酿酒酵母中乙醇耐受性研究表明,当细胞内的乙醇由于渗透压的缘故无法分泌到胞外时,过高的乙醇浓度会对细胞结构、线粒体中的酶活性和细胞质膜的组分产生影响,最终抑制细胞的生长甚至引起细胞死亡^[9]。在毕赤酵母发酵过程中,相关研究表明副产物乙醇的积累会抑制醇氧化酶启动子的诱导启动和外源蛋白的表达,但一般认为只要在诱导前采用“饥饿”培养的方法耗尽乙醇,后续的诱导过程就可以正常进行^[10]。长时间、高浓度的乙醇胁迫会不会对毕赤酵母细胞结构和生理状态造成不可逆转的影响还不明确,相关文献也未见报道。

本文以1株产猪 α 干扰素的毕赤酵母 *Pichia pastoris* KM71H 为研究对象,发现只要乙醇的积累曾经达到高浓度 (>4 g/L),并维持一段时间,即使诱导期前乙醇完全耗尽,诱导过程也不能正常进行。进一步从转录组学角度系统分析了乙醇胁迫抑制毕赤酵母表达外源蛋白的分子机制,为发酵过程控制提供了重要的理论依据,丰富了微生物细胞胁迫响应的研究体系。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

由上海农业科学院畜牧兽医所重点研究室构建的重组巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris*, KM71 和 Mut^S 菌株。表达载体和外源基因分别为 pPICZ α A 和 IFN α cDNA。

1.1.2 培养基

种子培养基 (g/L): 酵母粉 10, 葡萄糖 20, 蛋白胨 20。

发酵罐初始培养基 (g/L): 甘油 20 mL/L, K₂SO₄ 1, MgSO₄ 1, CaSO₄ 0.1, (NH₄)₂SO₄ 5, PTM₁ 10 mL/L, H₃PO₄ 2% (V/V), pH 6.0。

甘油流加培养基 (g/L): 甘油 500 mL/L, (NH₄)₂SO₄ 0.5, MgSO₄ 0.03, PTM₁ 10 mL/L, KH₂PO₄ 0.5, pH 6.0。

诱导流加培养基 (g/L): 甲醇 500 mL/L, (NH₄)₂SO₄ 0.5, MgSO₄ 0.03, PTM₁ 10 mL/L, KH₂PO₄ 0.5, pH 5.5。

山梨醇流加培养基 (g/L): 山梨醇 500。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与猪 α 干扰素的诱导表达方法

发酵实验在 5 L 发酵罐内进行,接种量为20%,初始体积为 1.5 L。毕赤酵母发酵生产猪 α 干扰素的过程主要由甘油培养阶段和诱导表达阶段组成。甘油培养阶段采用 ANNPR-Ctrl 流加策略控制甘油培养基的流加,培养温度为 30 °C, pH 为 6.0,直至细胞密度增至 120–130 g DCW/L 时,停止流加。经过 1–2 h 的饥饿培养,待甘油以及其他可以充当替代碳源的中间代谢物耗尽后开始流加甲醇诱导培养基,进入诱导阶段。在诱导阶段,根据甲醇电极读数人工调节蠕动泵转速,将发酵液中的甲醇浓度控制于 5 g/L,同时按照一定体积比 (甲醇流加培养基 : 山梨醇流加培养基=1 : 1) 添加山梨醇流加培养基。使用压缩空气供氧,始终维持最大的搅拌转速,温度和 pH 值分别控制在 30 °C 和 5.5。

1.2.2 乙醇和甲醇浓度测定

商用的膜渗透型甲醇电极 (上海苏泊公司, FC2002) 可以对乙醇和甲醇这一类挥发性的小分子有机物产生响应,其响应电压与有机物浓度存在二次曲线型的数量关系。利用不同浓度的甲醇和乙醇标准溶液,分别拟合出描述电极

输出电压与乙醇/甲醇浓度之间数量关系的标准曲线。在细胞培养阶段和诱导阶段,根据电极的输出电压,分别利用各自的标准曲线计算得到乙醇和甲醇的浓度。

1.2.3 甘油流加控制策略

控制方法与参考文献[7]相同。

1.2.4 菌浓度测定

测量方法与参考文献[11]相同。

1.2.5 猪 α 干扰素浓度测定

SDS-PAGE 蛋白电泳:使用 6%的浓缩胶和 12%的分离胶。使用 G:Box 生物成像系统拍照后,利用 QuantityOne 软件扫描电泳条带,定量分析猪 α 干扰素浓度。

1.2.6 总蛋白浓度测定

采用考马斯亮蓝法测定发酵液中的总蛋白浓度,操作步骤与参考文献[4]相同。

1.2.7 乙醇和甲醇浓度的离线测定

乙醇和甲醇浓度使用气相色谱仪测定,色谱条件与参考文献[12]相同。

1.2.8 毕赤酵母乙醇胁迫条件下基因表达差异的研究

在毕赤酵母细胞甘油培养 27 h 及诱导培养 12 h 后分别 8 000 r/min 离心收集菌体,用无菌水洗涤 1 次,在液氮中速冻 10 min 以上, -80°C 保存备用。采用酵母基因芯片 (8 \times 15 K, Agilent Technologies) 测定基因表达的差异, RNA 抽提、芯片杂交、扫描以及数据分析与参考文献[13]相同。所有芯片的表达数据均为处于高浓度乙醇 (4–8 g/L) 积累条件下与低浓度乙醇 (0–2 g/L) 积累条件下的两个样品的比值,如果 Fold change ≥ 1.5 , 并且 $P\text{-value} \leq 0.05$ 的基因认为是差异表达基因。

1.2.9 甲醇代谢关键酶基因转录水平的测定

甲醇代谢途径中的关键酶包括醇氧化酶 (Aox)、甲醛脱氢酶 (Fld)、二羟基丙酮酸合成酶 (Dhas) 和 H_2O_2 酶 (Cat), 分别由 *aox2*、*fld1*、*das2* 以及 *cat1* 基因编码, 基因转录水平的测定方法与文献报道[12]相同。

2 结果与分析

2.1 乙醇胁迫对毕赤酵母表达猪 α 干扰素的影响

在 5 L 发酵罐中进行毕赤酵母表达猪 α 干扰素实验,甘油培养期采用 ANNPR-Ctrl 控制策略流加甘油,甲醇诱导期使用甲醇/山梨醇共混流加策略 (甲醇/山梨醇培养基流加体积比 1 : 1) 进行诱导。发酵批次 1 到 3 在细胞密度达到 130 g DCW/L 左右时开始诱导,批次 4 则在细胞密度达到 100 g DCW/L 左右时开始诱导,图 1 显示了 4 个发酵批次的总蛋白表达量及甘油培养期乙醇浓度分别随时间变化的情况。其中批次 1、2 和 4 在诱导 70 h 后结束发酵,而批次 3 由于细胞失去代谢活性,DO 始终居高不下、耗氧速度 OUR ≈ 0 、甲醇基本不消耗,发酵被迫在诱导 13 h 终止。

如图 1A 所示,批次 1 到 4 的最高总蛋白表达量分别达到 30.85、15.31、9.38 和 17 mg/g DCW 的水平。与之相对应的,批次 1 到 4 中的猪 α 干扰素表达量分别为 16.54、10.38、0.85 和 12.6 mg/g DCW 的水平。批次 1 的总蛋白和猪 α 干扰素表达量均高于批次 4,表明在甘油培养期结束时获得极高的细胞密度的确有助于毕赤酵母表达外源蛋白。批次 1、2 和 3 相比较,虽然三者甘油培养期结束时的细胞密度相同,但总蛋白和猪 α 干扰素表达量存在显著差别,表明

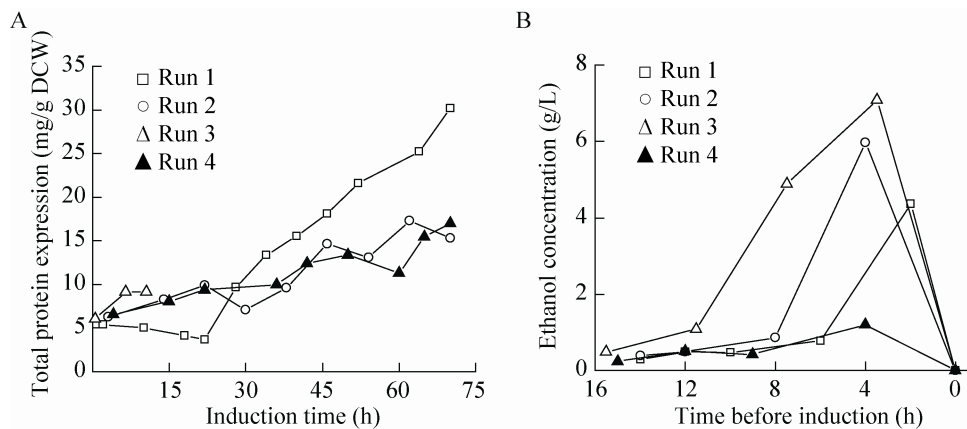


图 1 不同发酵批次下总蛋白表达量和乙醇浓度的变化情况

Fig. 1 Total protein expressions and ethanol concentrations during cultivation phase under different fermentation batches. (A) Total protein expressions during induction phase. (B) Ethanol concentrations during cultivation phase.

极高细胞密度下的发酵稳定性较差。因为批次 1 到批次 3 的甲醇诱导条件完全相同，所以甘油流加培养阶段的差异是造成 3 个批次发酵性能存在差异的主要原因。

对 4 个批次的甘油流加速度、流加数量以及流加培养末期的乙醇积累情况进行比较，发现三者在不同批次中均存在差别，尤其是甘油培养末期的乙醇积累情况差异显著。如图 1B 所示，4 个批次的流加培养末期均伴随有乙醇的生成积累。在批次 4 中，乙醇几乎不积累，最大乙醇浓度只有 1.2 g/L；在批次 1 中，乙醇从诱导开始前 6 h 开始积累，最大乙醇浓度为 4.29 g/L；在批次 3 中，乙醇开始积累的时间较早，诱导前 7.5 h 其浓度既已达到 4.77 g/L，诱导前 3.5 h 更是高达 6.95 g/L，且在高乙醇浓度环境下维持了较长时间。所有 4 个批次积累的乙醇均可以作为替代碳源，在“饥饿培养”期得到完全消耗，诱导开始时其浓度均降低到 0 水平。

分析乙醇积累的原因，可能是由于细胞培

养阶段的甘油流加速度不适宜，发酵液中积累了过量的碳源，DO 水平在大部分时间间隔内处于接近 0 的水平，培养体系处于厌氧状态，结果导致有害代谢副产物乙醇的积累。乙醇长时间、高浓度的积累，可能对毕赤酵母的功能性细胞骨架/结构的形成产生了不可逆转的破坏作用，最终影响后续外源蛋白的表达。

为进一步验证乙醇胁迫影响了毕赤酵母发酵稳定性的结论，我们在诱导前 8 h 刻意添加乙醇，将发酵液内的乙醇浓度瞬间提高至 6 g/L，然后维持乙醇浓度在 4 g/L 以上至少 4 h，最后使用与发酵批次 1 到 3 相同的甲醇/山梨醇共混流加策略进行诱导。结果显示，进入诱导阶段后，DO 始终维持在高水平，OUR 以及甲醇消耗速率极低，诱导 20 h 后细胞活性仍无法恢复，发酵被迫结束。该实验批次的最大总蛋白表达量为 5.92 mg/g DCW，最大猪 α 干扰素表达量只有 2.46 mg/g DCW，实验结果与批次 3 类似。该结果进一步证明了乙醇胁迫抑制毕赤酵母表达

外源蛋白,影响发酵稳定性的结论。目前,乙醇胁迫抑制毕赤酵母表达外源蛋白的分子机制还不得而知。因此,本课题组从转录组学角度对该分子机制进行了系统分析,为外部环境控制提供重要的理论依据。

2.2 乙醇胁迫条件下的基因表达差异

为研究不同浓度乙醇胁迫条件下毕赤酵母细胞中的基因表达差异,解析毕赤酵母代谢表达差异的原因,提取毕赤酵母在诱导开始前4 h(即甘油培养期27 h左右)及诱导开始后12 h的酵母胞内RNA作转录组分析,共得到4组RNA样品。G1和G2样品分别来自于诱导开始前4 h的发酵批次1和3,M1和M2号样品分别来自于诱导开始后12 h的发酵批次1和3(表1)。

基因芯片比较结果显示,在甘油培养末期的G1和G2样品间,差异表达基因数量为545个(上调表达的265个,下调表达的280个);在处于甲醇诱导期的M1和M2样品间,差异表达基因数量为294个(上调表达的171个,下调表达的123个)。

对G1和G2两个样本间的差异表达基因进行KEGG Pathway功能差异富集分析,符合 $P\text{-value} \leq 0.05$ 则被定义为显著性差异富集的信号代谢通路,结果如表2所示。由表2可知,大量的蛋白质加工合成相关基因、酵母细胞周

表1 样品编号及乙醇浓度范围

Table 1 Sample codes and ethanol concentration ranges

Expression phase	Code	Ethanol concentration range during cultivation phase (g/L)
Cultivation phase 27 h	G1	0-2
	G2	4-8
Induction phase 12 h	M1	0-2
	M2	4-8

表2 甘油培养期样品间KEGG Pathway功能差异富集分析

Table 2 KEGG pathway enrichment analysis between two samples during glycerol cultivation phase

Pathway	Pathway ID	P-value
Protein processing in endoplasmic reticulum	sce04141	0.005
Starch and sucrose metabolism	sce00500	0.021
Pentose phosphate pathway	sce00030	0.040
beta-Alanine metabolism	sce00410	0.041
Cell cycle-yeast	sce04111	0.031
Ribosome biogenesis in eukaryotes	sce03008	0.011
Peroxisome	sce04146	0.013
Ribosome	sce03010	0.000

期相关基因和能量代谢相关基因参与了毕赤酵母乙醇胁迫的响应调控,它们调节着毕赤酵母细胞的增殖、蛋白的合成以及能量的供应,对提高毕赤酵母乙醇耐受性具有重要意义。

对M1和M2两个样本间的差异表达基因进行KEGG Pathway功能差异富集分析,符合 $P\text{-value} \leq 0.05$ 则被定义为显著性差异富集的信号代谢通路,结果如表3所示。富集结果与甘

表3 甲醇诱导期样品间KEGG Pathway功能差异富集分析

Table 3 KEGG pathway enrichment analysis between two samples during induction phase

Pathway	Pathway ID	P-value
Glycolysis/Gluconeogenesis	sce00010	0.006
Starch and sucrose metabolism	sce00500	0.009
Ubiquitin mediated proteolysis	sce04120	0.018
Glycine, serine and threonine metabolism	sce00260	0.026
Protein processing in endoplasmic reticulum	sce04141	0.029
Tyrosine metabolism	sce00350	0.046
Ribosome biogenesis in eukaryotes	sce03008	0.017
Glutathione metabolism	sce00480	0.028
Pentose phosphate pathway	sce00030	0.047
Biosynthesis of amino acids	sce01230	0.027

油培养期类似,表明蛋白质加工合成相关基因和能量代谢相关基因不仅参与了毕赤酵母细胞乙醇胁迫的响应调控,也对毕赤酵母表达外源蛋白具有重要作用。因此,对这些代谢通路展开深入的研究对于揭示乙醇胁迫抑制毕赤酵母表达外源蛋白的分子机理具有重要意义。

2.3 基于转录组数据的甘油培养期乙醇胁迫分子机制

2.3.1 蛋白质生物合成代谢途径

蛋白质是生物活性物质中最重要的的大分子成分,作为生物功能的载体,酵母细胞内重要的生理活动都是由蛋白质来完成的。通过分析甘油培养期的 G1 和 G2 两个样品的差异表达基因,我们发现在乙醇胁迫下,毕赤酵母细胞内的蛋白质生物合成途径受到了明显影响。与蛋白质生物合成相关的差异表达基因共有 27 个(表 4),这些基因主要参与核糖体、核糖体生物合成以及内质网中的蛋白质加工 3 个代谢途径。

核糖体是真核生物细胞的重要细胞器,由 40S 亚基、60S 亚基和 4 种 RNA 组成,执行蛋白质合成的功能。由表 4 可知,与核糖体有关的差异基因在乙醇胁迫下均下调。核糖体蛋白是核糖体的重要组成成分。研究发现核糖体蛋白除了参与蛋白质的合成外,还参与细胞分化、细胞发育调控、DNA 修复等过程,在真核生物的生长发育过程中起到了至关重要的作用^[14]。核糖体相关基因的显著下调表明乙醇胁迫阻碍了毕赤酵母细胞内核糖体的正常合成,破坏了核糖体的结构。重要核糖体蛋白的缺失,使得细胞内核糖体的数量和质量都显著下降,酵母细胞增殖减缓并且更易死亡,这些是导致甲醇诱导期外源蛋白低产量的重要原因。

与核糖体生物合成有关的差异基因在乙醇胁迫下也是下调的,并且这些基因的功能都与核糖体内行使功能的主体 RNA 有关。其中,*afg2* 参与水解 ATP 和降解异常的 mRNA,它的下调会降低细胞正确折叠蛋白的能力,并提高核糖体翻译错误多肽链的情况^[15]。*rnt1* 具有核糖核酸酶活性,在前体 RNA 加工过程中不可或缺^[9];*utp5* 是具有加工前体 rRNA 活性的复合物的组成部分,参与核仁内 18S rRNA 的合成以及核糖体小亚基的装配过程^[16]。*rnt1* 和 *utp5* 这两种基因表达量的不足,会阻碍前体 rRNA 的加工,抑制多肽链的合成。

内质网是酵母细胞的重要细胞器。与内质网中蛋白质加工过程有关的差异基因在乙醇胁迫下都上调,其中 *hsp26* 基因上调较为显著。*hsp26* 和 *hsp82* 编码热激蛋白,该蛋白在蛋白质的组装和运输中起着非常重要的作用^[17]。*ssa3*、*ssa4* 和 *sse2* 属于热激蛋白中的 HSP70 家族,该家族的基因参与非折叠蛋白应答 (UPR) 过程,在细胞内起着抗凋亡的作用^[18]。*hsp26* 等基因的上调说明乙醇胁迫使得毕赤酵母细胞蛋白的正确折叠能力下降,不正常折叠情况增多,大量不具有正常功能的错误蛋白形成了聚集,抑制了毕赤酵母的正常生长及代谢。如果乙醇胁迫持续存在或是比较严重,那么 UPR 过程也不能修复细胞的正常功能,这就会诱发细胞的凋亡^[19]。结果使得我们在甘油培养末期得不到大量的具有健全功能的酵母细胞,导致甲醇诱导期外源蛋白产生低产量的情况。

2.3.2 能量代谢途径

酵母细胞的生长、发育,包括核酸、蛋白质的合成,生物膜的传递以及运输功能等,都

表 4 甘油培养期与蛋白质生物合成相关基因转录水平分析

Table 4 Transcriptional analysis of genes related to protein synthesis during glycerol cultivation phase

Gene	Gene function	Regulate	Ratio
Genes related to ribosome			
<i>rpl1a</i>	N-terminally acetylated protein component of the large (60S) ribosomal subunit	Down	0.65
<i>rpl8a</i>	Ribosomal protein L4 of the large (60S) ribosomal subunit	Down	0.52
<i>rpl11b</i>	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit; depletion causes degradation of proteins and RNA of the 60S subunit	Down	0.58
<i>rpl17b</i>	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit	Down	0.61
<i>rps8a</i>	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	Down	0.60
<i>rps9a</i>	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	Down	0.63
<i>rps11a</i>	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	Down	0.60
<i>rps11b</i>	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	Down	0.36
<i>rps13</i>	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	Down	0.59
<i>rps14a</i>	Ribosomal protein 59 of the small subunit, required for ribosome assembly and 20S pre-rRNA processing	Down	0.55
<i>rps14b</i>	Ribosomal protein 59 of the small subunit, required for ribosome assembly and 20S pre-rRNA processing	Down	0.58
<i>rps22a</i>	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	Down	0.36
<i>rps23b</i>	Ribosomal protein 28 of the small (40S) ribosomal subunit, required for translational accuracy; deletion of both <i>rps23a</i> and <i>rps23b</i> is lethal	Down	0.53
<i>rps25b</i>	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	Down	0.57
<i>rps27a</i>	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	Down	0.62
<i>rps27b</i>	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	Down	0.62
<i>rps28b</i>	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	Down	0.52
<i>rpp2a</i>	Ribosomal protein P2 alpha, which is involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome	Down	0.55
Genes related to ribosome biogenesis			
<i>afg2</i>	ATPase of the AAA family, which is essential for pre-60S maturation and release of several preribosome maturation factors	Down	0.61
<i>rnt1</i>	RNAase III; involved in rDNA transcription and rRNA processing; involved in polyadenylation-independent transcription termination	Down	0.56
<i>utp5</i>	Subunit of U3-containing Small Subunit processome complex involved in production of 18S rRNA and assembly of small ribosomal subunit	Down	0.50
Genes related to protein processing in endoplasmic reticulum			
<i>hsp26</i>	Small heat shock protein (sHSP) with chaperone activity; forms hollow, sphere-shaped oligomers that suppress unfolded proteins aggregation	Up	4.45
<i>hsp82</i>	HSP90 chaperone required for pheromone signaling and negative regulation of <i>hsf1p</i>	Up	2.06
<i>ssa3</i>	ATPase involved in protein folding and the response to stress; plays a role in SRP-dependent cotranslational protein-membrane targeting and translocation	Up	1.66
<i>ssa4</i>	Heat shock protein that is highly induced upon stress; plays a role in SRP-dependent cotranslational protein-membrane targeting and translocation	Up	2.82
<i>sse2</i>	Member of the heat shock protein 70 (HSP70) family; may be involved in protein folding	Up	2.08
<i>ubc4</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme (E2), mediates degradation of abnormal or excess proteins; interacts with many SCF ubiquitin protein ligases	Up	1.75

需要消耗能量。在乙醇胁迫下,一些与能量代谢相关的基因表达量产生了显著差异(表5),这些基因主要与线粒体降解、磷酸戊糖途径有关,其转录水平均上调。其中,*yil165c*具有水解酶活性,突变体表现为线粒体自噬缺陷。*yor019w*参与线粒体自噬过程,在线粒体质量控制方面具有重要作用^[20]。*yil165c*和*yor019w*的显著上调说明乙醇胁迫与线粒体的质量下降有关。乙醇胁迫导致线粒体内活性氧大量积累,线粒体的结构功能受到损害,激活了线粒体的自噬过程。磷酸戊糖途径具有为细胞的各种合成反应提供还原剂、防止膜脂过氧化、为细胞组分的合成提供原料等功能。该途径对于细胞抵抗氧化等微生物生理胁迫具有重要的保护作用^[21-22]。*gdb1*、*ima3*、*gnd2*、*nqm1*和*sol4*基因的上调表明乙醇胁迫下,磷酸戊糖途径对毕赤酵母细胞同样具有重要的保护作用。

2.3.3 细胞周期代谢途径

许多与细胞周期相关的基因表达量也具有显著差异,如表6所示。当受到乙醇胁迫时,与酵母分裂密切相关的*cyr1*和*mnd2*基因上调,*cdh1*等7个与酵母细胞周期相关基因的表达量

均下调。研究表明,在*cyr1*突变后酵母的时序寿命增加,相应的对抗H₂O₂和热能力加强;但在乙醇培养基中生长缓慢,荧光标记实验发现与野生菌相比,*cyr1*突变菌的线粒体膜有更好的完整性。*mnd2*基因上调说明乙醇胁迫减弱了细胞内姐妹染色单体凝聚力,而*cyr1*基因上调就应该与细胞消耗乙醇有关。但是在消耗乙醇的同时,却降低了自身对H₂O₂和热的抵抗能力;细胞的时序寿命也大为减少,酵母细胞的生存时间缩短。细胞周期是指从亲代细胞分裂结束到其子细胞分裂结束之间的时间间隔,即细胞完成一个循环的过程。酵母细胞分裂的正常进行依赖细胞周期各个进程的基因产物功能的正常发挥。*cdh1*等基因所编码的细胞周期蛋白等产物在细胞周期的各个进程中起着关键的作用,这些基因表达量的下调表明乙醇胁迫抑制了酵母细胞周期的顺利进行。

2.3.4 过氧化物酶代谢途径

乙醇胁迫下,一些与过氧化物酶相关的基因表达量也具有显著差异。过氧化物酶与降低氧气对机体的毒害作用有直接联系,并在细胞膜磷脂合成和降解中发挥重要作用^[23]。如表7所示,

表5 甘油培养期与能量代谢相关基因转录水平分析

Table 5 Transcriptional analysis of genes related to energy metabolism during glycerol cultivation phase

Gene	Gene function	Regulate	Ratio
<i>yil165c</i>	Putative protein of unknown function; mutant exhibits mitophagy defects	Up	1.53
<i>yor019w</i>	Protein of unknown function that may interact with ribosomes	Up	1.75
<i>gdb1</i>	Glycogen debranching enzyme containing glucoamylase and alpha-1,6-amyloglucosidase activities, required for glycogen degradation	Up	1.95
<i>ima3</i>	Alpha-glucosidase with broad substrate specificity for alpha-1,4- and alpha-1,6-glucosides; member of IMA isomaltase family	Up	1.66
<i>gnd2</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating), catalyzes an NADPH regenerating reaction in the pentose phosphate pathway	Up	1.56
<i>nqm1</i>	Transaldolase of unknown function; transcription is repressed by <i>mot1p</i> and induced by alpha-factor and during diauxic shift	Up	2.14
<i>sol4</i>	6-phosphogluconolactonase with similarity to <i>sol3p</i>	Up	1.61

表 6 甘油培养期与细胞周期相关基因转录水平分析

Table 6 Transcriptional analysis of genes related to cell cycle during glycerol cultivation phase

Gene	Gene function	Regulate	Ratio
<i>cyr1</i>	Adenylate cyclase, required for cAMP production and cAMP-dependent protein kinase signaling	Up	1.82
<i>mnd2</i>	Subunit of the anaphase-promoting complex (APC); necessary for maintaining sister chromatid cohesion in prophase I of meiosis	Up	1.72
<i>cdh1</i>	Cell-cycle regulated activator of APC/C, which directs ubiquitination of cyclins resulting in mitotic exit	Down	0.56
<i>clb1</i>	B-type cyclin involved in cell cycle progression; activates <i>cdc28p</i> to promote the transition from G2 to M phase	Down	0.58
<i>cln1</i>	G1 cyclin involved in regulation of the cell cycle; activates <i>cdc28p</i> kinase to promote the G1 to S phase transition	Down	0.63
<i>cln3</i>	G1 cyclin involved in cell cycle progression; activates <i>cdc28p</i> kinase to promote the G1 to S phase transition; plays a role in regulating transcription of the other G1 cyclins	Down	0.54
<i>pcl1</i>	Cyclin, involved in the regulation of polarized growth and morphogenesis and progression through the cell cycle	Down	0.45
<i>pho5</i>	Repressible acid phosphatase (1 of 3) that also mediates extracellular nucleotide-derived phosphate hydrolysis	Down	0.54
<i>tup1</i>	General repressor of transcription, involved in the establishment of repressive chromatin structure	Down	0.61

表 7 甘油培养期与过氧化物酶相关基因转录水平分析

Table 7 Transcriptional analysis of genes related to peroxisome during glycerol cultivation phase

Gene	Gene function	Regulate	Ratio
<i>cta1</i>	Catalase A, breaks down hydrogen peroxide in the peroxisomal matrix formed by acyl-CoA oxidase	Up	2.83
<i>ctl1</i>	Cytosolic catalase T, has a role in protection from oxidative damage by hydrogen peroxide	Up	1.80
<i>pex13</i>	Integral peroxisomal membrane protein required for translocation of peroxisomal matrix proteins	Up	1.84
<i>sym1</i>	Protein required for ethanol metabolism, induced by heat shock	Up	1.59
<i>pxa1</i>	Subunit of a heterodimeric peroxisomal ATP-binding cassette transporter complex, required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes	Up	1.77

当受到乙醇胁迫时,这些基因均上调。其中 *cta1* 表达量提高了几乎 2 倍,这可能是因为乙醇胁迫引起了细胞内 H_2O_2 的过量积累。而 H_2O_2 如果不能及时被清除,一方面由 H_2O_2 生成的羟基自由基对细胞会造成毒害;另一方面, H_2O_2 积累也会导致机体不能有效控制细胞膜磷脂合

成,结果酵母细胞对乙醇产生敏感性。研究发现敲除与过氧化物酶的功能有关的基因,包括 *pex12*、*pex14* 和 *pex15* 等,都会导致酿酒酵母乙醇敏感性的增加^[24-25]。因此,*cta1* 等基因表达量的上调有助于降低毕赤酵母对乙醇的敏感性。过氧化物酶体是真核细胞中重要的细胞器,

pex13 和 *pxa1* 的上调说明过氧化物酶体生物合成与酵母细胞响应乙醇胁迫有关。当细胞处于依赖乙醇生存的压力条件下时, *sym1* 编码的蛋白在维持细胞内氧化磷酸化过程、糖原贮存、线粒体形态以及 mtDNA 稳定上具有关键作用, 该基因上调说明细胞为了缓解乙醇胁迫的压力, 开始消耗乙醇作为碳源维持自身的生长。

2.4 基于转录组数据的甲醇诱导期乙醇胁迫分子机制

2.4.1 甲醇代谢途径

在甲醇诱导期, M1 和 M2 样品间甲醇代谢途径中各关键酶 (Aox、Fld、Cat 以及 Dhas) 的编码基因转录水平存在显著差异, 结果如表 8 所示。上述各关键酶在甲醇代谢途径中的作用如图 2 所示。结果表明, 甘油培养期的乙醇胁迫会对 *aox2* 基因的转录造成不可逆的抑制作用, 该抑制作用是细胞培养阶段乙醇积累降低 pIFN- α 发酵稳定性的主要原因。M2 号样品中 *aox2* 基因的转录水平仅达到 M1 样品的 22%, 而 *fld1*、*cat1* 和 *das2* 的转录水平却可以达到 M1 样品的 40% 左右。由此可见, 相对于 *aox2* 基因, 乙醇对 *fld1*、*cat1* 和 *das2* 转录造成的影响较小。

表 8 甲醇诱导期与甲醇代谢相关基因转录水平分析
Table 8 Transcriptional analysis of genes related to methanol metabolism during methanol induction phase

Genes	Gene function	Regulate	Ratio
<i>aox2</i>	Alcohol oxidase 2	Down	0.22
<i>fld1</i>	Formaldehyde dehydrogenase	Down	0.30
<i>cat1</i>	Catalase 1	Down	0.47
<i>das2</i>	Putative uridine kinase	Down	0.37

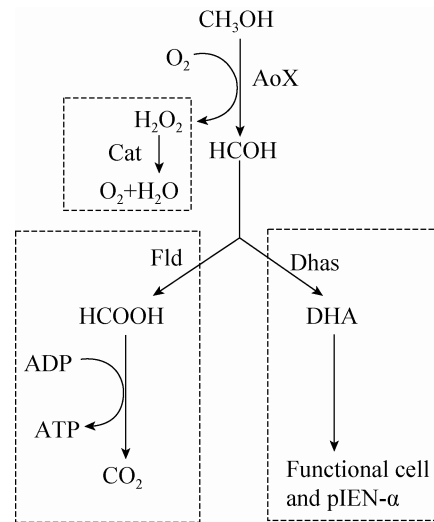


图 2 甲醇代谢中关键酶作用示意简图

Fig. 2 Simplified methanol metabolism map indicating the functions of key enzymes.

2.4.2 蛋白质生物合成代谢途径

如前所述, 蛋白质是生物活性物质中最重要的大分子成分, 是生物功能的载体。甲醇诱导期外源蛋白的高表达取决于毕赤酵母细胞内蛋白质合成加工的高效有序进行。虽然毕赤酵母细胞在甲醇诱导期没有直接受到乙醇的胁迫, 但是许多与蛋白质加工合成有关的基因, 特别是蛋白质折叠、降解有关的基因表达量依然产生了显著差异 (表 9)。 *hsp26*、*hsp82*、*ssa1*、*ssa2* 和 *ssa4* 与内质网中蛋白质加工过程有关, 这些基因基本呈下调趋势。比较甲醇诱导期和甘油培养期的差异基因表达情况, 发现两者的基因类别相差不大, 但是基因的调控水平却正好相反。诱导期这些相关基因的低表达量会抑制非折叠蛋白应答过程, 使得内质网内的未折叠蛋白持续积累而不能被及时清除, 细胞更易遭受多种因子诱导的细胞毒性, 这些结果应该

是导致甲醇诱导期外源蛋白产量显著下降的直接原因。

泛素是一种存在于大多数真核细胞中的小蛋白，它的主要功能是标记需要分解掉的蛋白质，使其被水解^[26]。泛素蛋白酶体系是降解细胞内蛋白质的主要途径。细胞中的蛋白质处于不断地降解与更新的过程中，保持细胞正常的蛋白质代谢对于生命的正常功能至关重要。与泛素介导的蛋白水解有关的差异基因包括 *apc9*、*uba3*、*ubc12* 和 *ubc8* 等，如表 9 所示。其中，*apc9* 编码后期促进因子 (APC) 的重要组成部分。*uba3* 编码 Nedd8 激活蛋白。*ubc12* 编码 Nedd8 缀合蛋白。*ubc8* 编码 E2 泛素结合蛋白。在所有真核细胞中细胞的增殖均严格依

赖于泛素连接酶 (E3) 有丝分裂后期促进因子的活性，没有 APC 的存在，细胞就不能分离姐妹染色单体，细胞增殖会被阻碍^[27]。*apc9* 的下调说明甲醇诱导期细胞的增殖被严重阻碍了。Nedd8 是一种能够对底物蛋白进行修饰的类泛素蛋白。目前已知，Nedd8 主要通过修饰 Cullin 蛋白而调控 Cullin-RING E3 连接酶的活性，进而参与到细胞周期调控、转录与信号传导等生物学过程^[28]。*uba3* 和 *ubc12* 的下调减少了 Nedd8 蛋白的合成，进而给细胞周期、转录等生理过程带来不利影响。*ubc8* 直接参与泛素蛋白酶体系，它的下调会抑制细胞内蛋白质的降解。细胞中蛋白质代谢缓慢会直接损害机体的正常功能。

表 9 甲醇诱导期与蛋白质生物合成相关基因转录水平分析

Table 9 Transcriptional analysis of genes related to protein synthesis during methanol induction phase

Gene	Gene function	Regulate	Ratio
Genes related to protein processing in endoplasmic reticulum			
<i>hsp26</i>	Small heat shock protein (sHSP) with chaperone activity; forms hollow, sphere-shaped oligomers that suppress unfolded proteins aggregation	Down	0.15
<i>hsp82</i>	HSP90 chaperone required for pheromone signaling and negative regulation of <i>hsf1p</i>	Down	0.50
<i>ssa1</i>	ATPase involved in protein folding and nuclear localization signal (NLS)-directed nuclear transport; member of heat shock protein 70 family	Down	0.40
<i>ssa2</i>	ATP binding protein involved in protein folding and vacuolar import of proteins; member of heat shock protein 70 family	Down	0.56
<i>ssa4</i>	Heat shock protein that is highly induced upon stress; plays a role in SRP-dependent cotranslational protein-membrane targeting and translocation	Down	0.50
Genes related to ubiquitin mediated proteolysis			
<i>apc9</i>	Subunit of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome, which is a ubiquitin-protein ligase required for degradation of anaphase inhibitors	Down	0.36
<i>uba3</i>	Protein that acts together with <i>ula1p</i> to activate <i>rub1p</i>	Down	0.36
<i>ubc12</i>	Enzyme that mediates the conjugation of <i>rub1p</i> to other proteins, related to E2 ubiquitin-conjugating enzymes	Down	0.60
<i>ubc8</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme that negatively regulates gluconeogenesis by mediating the glucose-induced ubiquitination of fructose-1,6-bisphosphatase	Down	0.55

2.4.3 能量代谢途径

在甲醇诱导期,一些与能量代谢相关的基因转录水平也产生了显著差异,这些基因主要与糖酵解/葡萄糖异生作用有关,如表 10 所示。由表 10 中各基因的功能可以看出, *adh5* 等相关基因在糖酵解/葡萄糖异生过程中起着重要的作用,这些基因的下调说明甲醇诱导期的糖酵解途径被显著抑制了。

2.4.4 氨基酸代谢途径

gcv2、*hom2*、*ald3*、*gad1*、*adh5*、*dug1* 和 *gpx2* 等基因与氨基酸代谢密切相关,在甲醇诱导

期这些基因的转录水平产生了显著差异(表 11)。除了与谷胱甘肽代谢相关的基因上调之外,其他基因均下调。谷胱甘肽所含的谷氨酰胺键能维持分子的稳定性并参与转运氨基酸^[29]。因此, *dug1* 和 *gpx2* 的上调对维持酵母细胞正常生理代谢包括表达外源蛋白具有积极的作用。氨基酸是构成细胞内各种蛋白质的基本单位,某些氨基酸还参与一些特殊的代谢反应,具有重要的特性。*gcv2* 等基因的下调会破坏毕赤酵母细胞内氨基酸的正常代谢,从而抑制外源蛋白的高效表达。

表 10 甲醇诱导期与能量代谢相关基因转录水平分析

Table 10 Transcriptional analysis of genes related to energy metabolism during methanol induction phase

Gene	Gene function	Regulate	Ratio
<i>adh5</i>	Alcohol dehydrogenase isoenzyme V; involved in ethanol production	Down	0.57
<i>ald3</i>	Cytoplasmic aldehyde dehydrogenase, involved in beta-alanine synthesis	Down	0.50
<i>gpm1</i>	Tetrameric phosphoglycerate mutase, mediates the conversion of 3-phosphoglycerate to 2-phosphoglycerate during glycolysis and the reverse reaction during gluconeogenesis	Down	0.55
<i>pck1</i>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, key enzyme in gluconeogenesis, catalyzes early reaction in carbohydrate biosynthesis, glucose represses transcription and accelerates mRNA degradation	Down	0.44
<i>tpi1</i>	Triose phosphate isomerase, abundant glycolytic enzyme	Down	0.46

表 11 甲醇诱导期与氨基酸代谢相关基因转录水平分析

Table 11 Transcriptional analysis of genes related to amino acid metabolism during methanol induction phase

Gene	Gene function	Regulate	Ratio
<i>gcv2</i>	P subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex, required for the catabolism of glycine to 5,10-methylene-THF	Down	0.61
<i>hom2</i>	Aspartic beta semi-aldehyde dehydrogenase, catalyzes the second step in the common pathway for methionine and threonine biosynthesis	Down	0.47
<i>ald3</i>	Cytoplasmic aldehyde dehydrogenase, involved in beta-alanine synthesis	Down	0.50
<i>gad1</i>	Glutamate decarboxylase, converts glutamate into gamma-aminobutyric acid during glutamate catabolism	Down	0.61
<i>adh5</i>	Alcohol dehydrogenase isoenzyme V, involved in ethanol production	Down	0.57
<i>dug1</i>	Cys-Gly metallo-di-peptidase; forms a complex with <i>dug2p</i> and <i>dug3p</i> to degrade glutathione and other peptides	Up	1.56
<i>gpx2</i>	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase induced by glucose starvation	Up	1.69

3 讨论

在利用毕赤酵母表达猪 α 干扰素的过程中,当甘油培养期毕赤酵母细胞达到极高密度(130 g DCW/L)时,外源蛋白猪 α 干扰素表达量最高达到 16.54 mg/g DCW,但发酵过程稳定性较差。如果甘油流加速度不适宜,或者培养体系长期处于厌氧状态,代谢副产物乙醇就可能大量积累。乙醇胁迫会显著影响甲醇诱导过程的启动效率,导致外源蛋白表达量下降,甚至诱导失败。

进一步采用转录组学技术分析不同批次(高浓度乙醇积累和低浓度乙醇积累)诱导效率出现显著差异的原因。结果表明在甘油培养期,乙醇胁迫影响了毕赤酵母细胞内蛋白质加工合成、能量代谢等途径的相关基因的表达,导致了细胞内错误折叠蛋白增多,核糖体、线粒体结构完整性下降,细胞更易死亡等问题,使得在甘油培养末期无法得到大量具有健全功能的细胞,影响了毕赤酵母在诱导期表达外源蛋白的稳定性。在甲醇诱导期,细胞虽然没有直接受到乙醇的胁迫,但是与甲醇代谢、蛋白质加工合成、氨基酸代谢等途径相关基因的表达量依然发生了显著变化,导致内质网胁迫不能被及时解除,多种氨基酸不能正常代谢,直接导致外源蛋白表达的不稳定。

本研究结果对于深入理解高细胞密度下的外源蛋白诱导启动机制,建立高效稳定的发酵过程在线控制系统具有重要意义。同时丰富了微生物细胞胁迫响应的研究体系,有助于从系统生物工程的角度提升传统发酵控制策略的内涵。

REFERENCES

- [1] Cereghino GPL, Cereghino JL, Ilgen C, et al. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13(4): 329–332.
- [2] Liang SL, Wang B, Pan L, et al. Comprehensive structural annotation of *Pichia pastoris* transcriptome and the response to various carbon sources using deep paired-end RNA sequencing. *BMC Genomics*, 2012, 13: 738.
- [3] Gao MJ, Dong SJ, Yu RS, et al. Improvement of ATP regeneration efficiency and operation stability in porcine interferon- α production by *Pichia pastoris* under lower induction temperature. *Korean J Chem Eng*, 2011, 28(6): 1412–1419.
- [4] Gao MJ, Li Z, Yu RS, et al. Methanol/sorbitol co-feeding induction enhanced porcine interferon- α production by *P. pastoris* associated with energy metabolism shift. *Bioproc Biosyst Eng*, 2012, 35(7): 1125–1136.
- [5] Zhu TC, Hang HF, Chu J, et al. Transcriptional investigation of the effect of mixed feeding to identify the main cellular stresses on recombinant *Pichia pastoris*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2013, 40(2): 183–189.
- [6] Baumann K, Carnicer M, Dragosits M, et al. A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions. *BMC Syst Biol*, 2010, 4: 141.
- [7] Gao MJ, Zheng ZY, Wu JR, et al. Improvement of specific growth rate of *Pichia pastoris* for effective porcine interferon- α production with an on-line model-based glycerol feeding strategy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(4): 1437–1445.
- [8] Wei C, Zhou XS, Zhang YX. Improving intracellular production of recombinant protein in *Pichia pastoris* using an optimized preinduction glycerol-feeding scheme. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78(2): 257–264.
- [9] Catala M, Tremblay M, Samson É, et al. Deletion of Rnt1p alters the proportion of open versus closed rRNA gene repeats in yeast. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(2): 619–629.
- [10] Baumann K, Maurer M, Dragosits M, et al.

- Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 100(1): 177–183.
- [11] Yu RS, Dong SJ, Zhu YM, et al. Effective and stable porcine interferon- α production by *Pichia pastoris* fed-batch cultivation with multi-variables clustering and analysis. *Bioproc Biosyst Eng*, 2010, 33(4): 473–483.
- [12] Jin H, Liu GQ, Ye XF, et al. Enhanced porcine interferon- α production by recombinant *Pichia pastoris* with a combinational control strategy of low induction temperature and high dissolved oxygen concentration. *Biochem Eng J*, 2010, 52(1): 91–98.
- [13] Liang JC, Zeng FL, Guo AZ, et al. Microarray analysis of the chelerythrine-induced transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Microbiol*, 2011, 62(4): 1200–1208.
- [14] Tedesco V, Roquet RF, DeMis J, et al. Extinction, applied after retrieval of auditory fear memory, selectively increases zinc-finger protein 268 and phosphorylated ribosomal protein S6 expression in prefrontal cortex and lateral amygdala. *Neurobiol Learn Mem*, 2014, 115: 78–85.
- [15] Iyer LM, Leippe DD, Koonin EV, et al. Evolutionary history and higher order classification of AAA plus ATPases. *J Struct Biol*, 2004, 146(1/2): 11–31.
- [16] Dragon F, Gallagher JEG, Compagnone-Post PA, et al. A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature*, 2002, 417(6892): 967–970.
- [17] Kalmar B, Greensmith L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv Drug Deliver Rev*, 2009, 61(4): 310–318.
- [18] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*, 2004, 116(2): 205–219.
- [19] Luo HH, Wong J, Wong B. Protein degradation systems in viral myocarditis leading to dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*, 2010, 85(2): 347–356.
- [20] Twig G, Elorza A, Molina AJA, et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J*, 2008, 27(2): 433–446.
- [21] Boada J, Roig T, Perez X, et al. Cells overexpressing fructose-2, 6-bisphosphatase showed enhanced pentose phosphate pathway flux and resistance to oxidative stress. *FEBS Lett*, 2000, 480(2/3): 261–264.
- [22] Gorsich SW, Dien BS, Nichols NN, et al. Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes *ZWF1*, *GND1*, *RPE1*, and *TKL1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 71(3): 339–349.
- [23] Marks VD, Sui SJH, Erasmus D, et al. Dynamics of the yeast transcriptome during wine fermentation reveals a novel fermentation stress response. *FEMS Yeast Res*, 2008, 8(1): 35–52.
- [24] Teixeira MC, Raposo LR, Mira NP, et al. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(18): 5761–5772.
- [25] Yoshikawa K, Tanaka T, Furusawa C, et al. Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 2009, 9(1): 32–44.
- [26] Clague MJ, Urbe S. Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell*, 2010, 143(5): 682–685.
- [27] Penkner AM, Prinz S, Ferscha S, et al. Mnd2, an essential antagonist of the anaphase-promoting complex during meiotic prophase. *Cell*, 2005, 120(6): 789–801.
- [28] Liu S, Yang H, Zhao J, et al. NEDD8 Ultimate Buster-1 Long (NUB1L) protein promotes transfer of NEDD8 to proteasome for degradation through the P97^{UFD1/NPL4} complex. *J Biol Chem*, 2013, 288(43): 31339–31349.
- [29] Lei XG, Cheng WH, McClung JP. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Annu Rev Nutr*, 2007, 27: 41–61.

(本文责编 郝丽芳)