

• 工业生物技术 •

敲除 *MIG1* 和 *SNF1* 基因对酿酒酵母共利用葡萄糖和木糖的影响

蔡艳青^{1,2}, 齐显尼², 齐奇^{2,3}, 蔺玉萍², 王正祥¹, 王钦宏²

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 中国科学院系统微生物工程重点实验室, 天津 300308

3 中国科学院大学, 北京 100049

蔡艳青, 齐显尼, 齐奇, 等. 敲除 *MIG1* 和 *SNF1* 基因对酿酒酵母共利用葡萄糖和木糖的影响. 生物工程学报, 2018, 34(1): 54–67.
Cai YQ, Qi XN, Qi Q, et al. Effect of *MIG1* and *SNF1* deletion on simultaneous utilization of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*. Chin J Biotech, 2018, 34(1): 54–67.

摘要: *Mig1* 和 *Snf1* 是酿酒酵母葡萄糖阻遏效应的两个关键调控因子。为了提高酿酒酵母工程菌同时利用葡萄糖和木糖的能力, 分别对 *MIG1* 和 *SNF1* 基因进行了单敲除和双敲除, 并通过摇瓶发酵实验和 RNA-Seq 转录组分析, 初步揭示了 *Mig1* 和 *Snf1* 可能影响葡萄糖和木糖共利用表达差异基因的层级调控机制。研究表明, *MIG1* 单敲除对混合糖的共利用影响不大; *SNF1* 单敲除会加快混合糖中木糖的利用而且葡萄糖和木糖可以被同时利用, 这可能归因于 *SNF1* 单敲除会解除对一些氮分解代谢阻遏基因表达的抑制, 从而促进了细胞对氮源营养的利用; 进一步敲除 *MIG1*, 会解除更多氮分解代谢阻遏基因表达的抑制, 以及一些碳中心代谢途径基因表达上调。虽然 *MIG1* 和 *SNF1* 双敲除菌株利用葡萄糖加快而利用木糖变慢, 但是葡萄糖和木糖可以被同时利用, 进而加快乙醇的积累。综上所述, *MIG1* 和 *SNF1* 的敲除导致氮分解阻遏基因表达上调, 有助于促进葡萄糖和木糖的共利用; 解析 *Mig1* 和 *Snf1* 对氮分解阻遏基因的层级调控作用, 为进一步提高葡萄糖和木糖的共利用提供新的靶点。

关键词: 酿酒酵母, 葡萄糖阻遏, *MIG1*, *SNF1*, RNA-Seq, 氮分解代谢阻遏

Received: March 10, 2017; **Accepted:** May 27, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31270098), Natural Science Foundation of Tianjin, China (No. 16JCYBJC43100).

Corresponding authors: Yuping Lin. Tel: +86-22-24828705; Fax: +86-22-84861950; E-mail: lin_yp@tib.cas.cn

Qinhong Wang. Tel/Fax: +86-22-84861950; E-mail: wang_qh@tib.cas.cn

国家自然科学基金 (No. 31270098), 天津市自然科学基金 (No. 16JCYBJC43100) 资助。

网络出版时间: 2017-09-14

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170914.1048.004.html>

Effect of *MIG1* and *SNF1* deletion on simultaneous utilization of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*

Yanqing Cai^{1,2}, Xianni Qi², Qi Qi^{2,3}, Yuping Lin², Zhengxiang Wang¹, and Qinhong Wang²

¹ College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

² Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

³ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Mig1 and Snf1 are two key regulatory factors involved in glucose repression of *Saccharomyces cerevisiae*. To enhance simultaneous utilization of glucose and xylose by engineered *S. cerevisiae*, single and double deletion strains of *MIG1* and *SNF1* were constructed. Combining shake flask fermentations and transcriptome analysis by RNA-Seq, the mechanism of Mig1 and Snf1 hierarchically regulating differentially expressed genes that might affect simultaneous utilization of glucose and xylose were elucidated. *MIG1* deletion did not show any significant effect on co-utilization of mixed sugars. *SNF1* deletion facilitated xylose consumption in mixed sugars as well as co-utilization of glucose and xylose, which might be due to that the *SNF1* deletion resulted in the de-repression of some genes under nitrogen catabolite repression, thereby favorable to the utilization of nitrogen nutrient. Further deletion of *MIG1* gene in the *SNF1* deletion strain resulted in the de-repression of more genes under nitrogen catabolite repression and up-regulation of genes involved in carbon central metabolism. Compared with wild type strain, the *MIG1* and *SNF1* double deletion strain could co-utilize glucose and xylose, and accelerate ethanol accumulation, although this strain consumed glucose faster and xylose slower. Taken together, the *MIG1* and *SNF1* deletions resulted in up-regulation of genes under nitrogen catabolite repression, which could be beneficial to simultaneous utilization of glucose and xylose. Mig1 and Snf1 might be involved in the hierarchical regulatory network of genes under nitrogen catabolite repression. Dissection of this regulatory network could provide further insights to new targets for improving co-utilization of glucose and xylose.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, glucose repression, *MIG1*, *SNF1*, RNA-Seq, nitrogen catabolite repression

利用可再生的木质纤维素生物质生产生物燃料和生物基化学品是解决全球可持续发展所面临的资源和环境问题的重要途径之一。木质纤维素主要由纤维素 (38%–50%)、半纤维素 (23%–32%) 和木质素 (15%–30%) 组成^[1]。当前工业条件下, 木质纤维素经过预处理技术解离出纤维素和半纤维素, 随后被纤维素酶等水解成微生物可发酵的糖类^[2], 水解液中木糖的含量仅次于葡萄糖。目前, 如何实现木糖的高效转化以及与葡萄糖的共利用依然是阻碍木质纤维素类生物质经济性利用的主要关键因素。

自然界中有许多微生物包括细菌、真菌和酵母菌可以利用木糖, 而酵母菌由于具有较强的工业应用属性, 引起人们的广泛关注。利用木糖的酵母菌主要可以分为两大类: 一类是以树干毕赤酵母 *Pichia stipitis* 为代表的天然利用木糖的酵母

菌, 另一类是携带外源木糖代谢途径的酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 工程菌。然而, 葡萄糖阻遏效应 (Glucose repression) 在酵母菌糖代谢调控中普遍存在。无论是天然菌^[3]还是工程菌^[4–5], 在利用葡萄糖和木糖的混合糖时都表现出葡萄糖的优先利用现象, 也就是说, 木糖只有在葡萄糖耗尽后才开始被利用, 从而导致发酵过程的总糖转化率和生产强度降低。在混合糖条件下酿酒酵母工程菌不能速效利用木糖的原因之一可能是由于葡萄糖抑制木糖代谢所需基因的表达, 葡萄糖对这些基因表达抑制作用的解除或缓解有利于促进混合糖条件下木糖的利用效率。有研究表明, 酿酒酵母工程菌的一些糖转运蛋白可以非特异地转运木糖, 例如 Hxt7, 但在葡萄糖存在条件下 *HXT7* 的表达受抑制, 从而限制混合糖条件下木糖的转运和利用^[6]。Wahlbom 等^[7]通过研究

化学诱变获得的木糖代谢能力提高的突变工程菌中基因表达水平的变化,发现该突变株中一些参与糖转运、初始木糖代谢和磷酸戊糖途径的基因表达加强,而且突变株在木糖唯一碳源条件下葡萄糖阻遏效应关键抑制因子 *MIG1* 的表达水平也降低,但未明确指出表明 *MIG1* 是否直接参与葡萄糖抑制木糖代谢的调控。de Figueiredo Vilela 等^[8]通过进化工程 (Evolutionary engineering) 获得木糖代谢效率提升的菌株,与出发菌株相比,该进化菌的 *HXT2* (编码低亲和力己糖转运蛋白) 和 *TAL1* (编码磷酸戊糖途径非氧化阶段的转醛酶) 表达水平均升高。另一方面有研究表明, *MIG1* 的敲除能部分缓解工程菌中葡萄糖对木糖代谢的抑制作用,提高木糖在葡萄糖保持低水平的限碳或限氮连续发酵时的发酵能力^[9-10]。另外,呼吸缺陷菌株经过工程改造和进一步的适应性进化后,木糖的发酵能力得到提高,这可能与经由 Snf1/Mig1 的葡萄糖感应和阻遏调控途径受到扰动有关^[11]。虽然以上研究表明葡萄糖阻遏木糖代谢所需基因的表达可能是在混合糖条件下工程菌不能速效利用木糖的原因之一,另一方面也表明解除或扰动葡萄糖阻遏效应的关键因子可能有助于实现葡萄糖和木糖的共利用。然而,尚无研究报明确指出 *MIG1* 和/或 *SNF1* 如何影响混合糖条件下木糖代谢所需基因的表达调控。

关于酿酒酵母的葡萄糖阻遏效应已经有大量的研究^[12-15]。*MIG1* 和 *SNF1* 是葡萄糖阻遏效应的两个关键因子。*MIG1* 基因编码一个含有 2 个 C_2H_2 锌指结构的蛋白,可以结合到一些基因的启动子区域,在葡萄糖存在的条件下抑制这些基因的转录,例如麦芽糖、蔗糖和半乳糖代谢相关的酶基因^[16-17]。Mig1 受 Snf1 的负调控。*SNF1* 编码一个蛋白激酶,是碳代谢中的中心调节因子,可用于解除葡萄糖对次级碳源的阻碍作用,如麦芽糖、半乳糖、蔗糖等。在葡萄糖存在的条件下,Snf1 的活性受到抑制^[18-19]。在没有葡萄糖或葡萄

糖浓度很低的条件下,Snf1 磷酸化 Mig1,使细胞核中的 Mig1 转移到细胞质中,不能再结合到基因启动子上抑制基因的转录表达,从而导致葡萄糖所抑制基因的表达解抑制^[20-21]。因此,葡萄糖阻遏效应可以归结为 3 个连续的负调控步骤:葡萄糖抑制 Snf1 的活性,Snf1 抑制 Mig1 转录抑制因子的功能,Mig1 抑制靶基因的转录。

本实验利用前期构建的一株可以利用木糖的酿酒酵母工程菌株 W32N55a,通过同源重组技术分别对葡萄糖阻遏效应中的关键基因 *SNF1* 和 *MIG1* 基因进行单敲除和双敲除,然后评价了敲除菌株对葡萄糖和木糖共利用的性能,并利用转录组测序 (RNA-seq) 技术分析了在低浓度混合糖条件下 *MIG1* 和 *SNF1* 单敲除和双敲除对全基因组水平上基因表达谱的影响。发现 *SNF1* 的敲除以及与 *MIG1* 的双敲除有利于葡萄糖和木糖的共利用,初步揭示了 Mig1 和 Snf1 在负调控氮分解阻遏基因中的作用,同时,为进一步提高葡萄糖和木糖的共利用提供了依据和线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本文所用菌株和质粒见表 1。

1.1.2 引物

根据 *Saccharomyces Genome Database* (SGD, ID: S000003003) 中报道的酿酒酵母中 *MIG1* 基因序列,设计两对同源臂片段扩增引物 F1、R1 和 F2、R2;根据质粒 pYES2/CT-ZGO-ZeoR 中 *ZeoR* 表达框,设计引物 F3、R3;敲除验证引物 F4、R4。根据 SGD (ID: S000002885) 中报道的酿酒酵母中 *SNF1* 基因序列,设计两对同源臂片段扩增引物 F5、R5 和 F6、R6;根据质粒 pRS313-ZGO-KanR 中 *KanR* 表达框,设计引物 F7、R7;敲除验证引物 F8、R8。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。本文所用引物见表 2。

表 1 本研究使用的酿酒酵母菌株和质粒

Table 1 *S. cerevisiae* strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Characteristics	Source
<i>S. cerevisiae</i> strains		
W32N55a	MATa, <i>PsXR</i> , <i>PsXDH</i> , <i>ScXK</i>	Provided by Yin Li lab at Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences
W32N55a (<i>mig1</i> Δ 0)	W32N55a (<i>mig1::ZeoR</i>)	This study
W32N55a (<i>snf1</i> Δ 0)	W32N55a (<i>snf1::KanR</i>)	This study
W32N55a (<i>mig1</i> & <i>snf1</i> Δ 0)	W32N55a (<i>mig1::ZeoR</i> , <i>snf1::KanR</i>)	This study
Plasmids		
pYES2/CT-ZGO-ZeoR	Plasmid carrying <i>ZeoR</i> gene	This lab
pRS313-ZGO-KanR	Plasmid carrying <i>KanR</i> gene	This lab

PsXR: xylose reductase from *P. stipitis*; *PsXDH*: xylitol dehydrogenase from *P. stipitis*; *ScXK*: xylulokinase from *S. cerevisiae*.

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')	Restriction site
F1	GAGAAACTCCAGAGTGGCGT	
R1	CGGGGTACCATCAACGTTAGACACTTGTG	<i>Kpn</i> I
F2	CGCGGATCCCCACACATGGACTGATACG	<i>Bam</i> H I
R2	TGACGAGACAACCAACCACC	
F3	CGGGGTACCCATATGCCACACACCATAG	<i>Kpn</i> I
R3	CGCGGATCC GATATCAGCTTGCAAATTA	<i>Bam</i> H I
F4	AGTACTCATTAAACGAAGAC	
R4	TCCTGCTCCTCGGCCACGAAGT	
F5	CCACATGACGCAAGTAACTT	
R5	CGGGGTACCTTGTGTGTTACTGCTCATGTT	<i>Kpn</i> I
F6	AAATATGCGGCCGCATGGAATTAGCCGTTAACAG	<i>Not</i> I
R6	TGGCAGCATGATTTGATATC	
F7	CGGGGTACC CCCGGGCGTACGCTGCA	<i>Kpn</i> I
R7	AAATATGCGGCCGC CGGCCGATCGATGAATTCCG	<i>Not</i> I
F8	TGCGCATTTCGTGTCCAAACA	
R8	GCATCAACAATATTTTACC	

1.1.3 主要试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶、*Pfu* DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自北京全式金生物技术有限公司；蛋白胨、酵母提取物购自英国 Oxoid 公司；博来霉素、G418 购自北京索莱宝公司；葡萄糖、木糖购自北京国药集团有限公司。核酸电泳仪、凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司；PTC100 型 PCR 仪购自美国 M J Research 公司等。

1.2 方法

1.2.1 *SNF1* 和 *MIG1* 基因同源重组 DNA 片段的构建

MIG1 基因敲除同源片段的构建过程如图 1A 所示。以 W32N55a 菌株基因组为模板，用引物对 F1/R1 和 F2/R2，分别扩增 *MIG1* 基因两端同源臂 *mig1*-up 和 *mig1*-down，各 500 bp 左右。以质粒 pYES2/CT-ZGO-ZeoR 为模板，用引物对

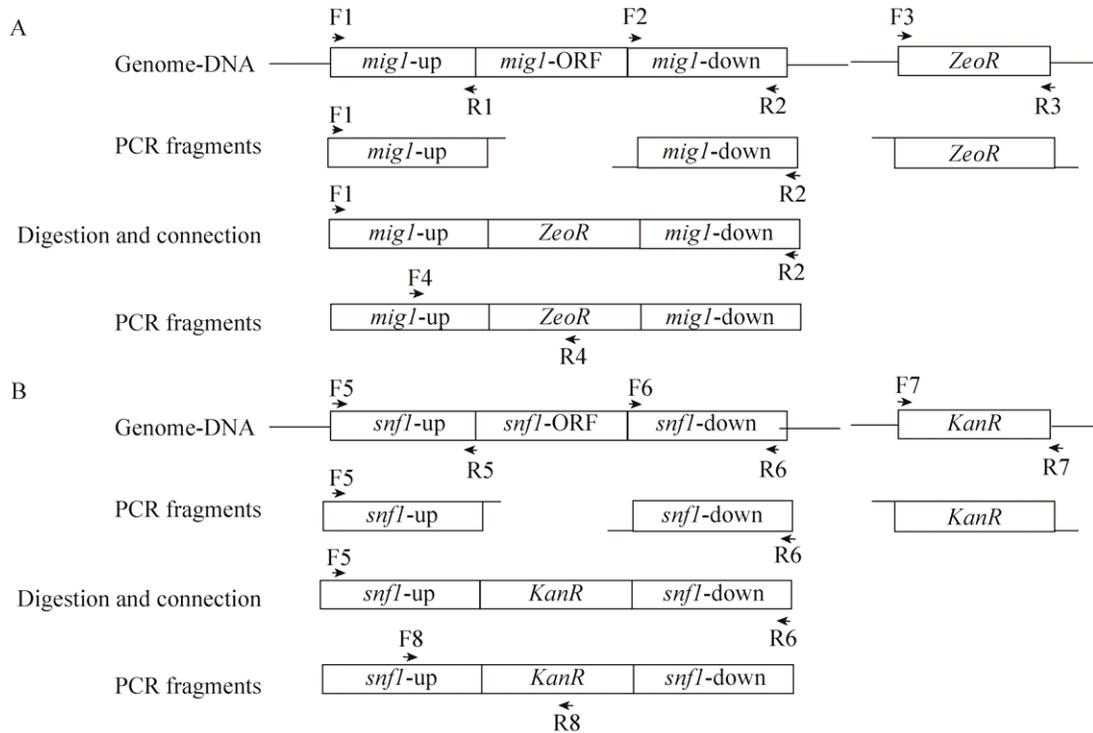


图 1 *MIG1* 和 *SNF1* 基因敲除同源片段的构建过程

Fig. 1 Working flow for *MIG1* and *SNF1* disruption cassette construction.

F3/R3 扩增基因 *ZeoR* 表达框, 大小为 1 200 bp 左右。用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Bam*H I 将相应片段分别酶切, 用 T4 DNA 连接酶将获得的片段 *mig1-up*、*ZeoR*、*mig1-down* 连接起来获得 *MIG1* 基因敲除同源片段“*mig1-up-ZeoR-mig1-down*”, 并用引物对 F1/R2 扩增此片段, 大小约为 2 200 bp。

SNF1 基因敲除同源片段的构建过程如图 1B 所示。以 W32N55a 菌株基因组为模板, 用引物对 F5/R5 和 F6/R6, 分别扩增 *SNF1* 基因两端同源臂 *snf1-up* 和 *snf1-down*, 各 500 bp 左右。以质粒 pRS313-ZGO-KanR 为模板, 用引物对 F7/R7 扩增基因 *KanR* 表达框, 大小为 1 500 bp 左右。用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Not* I 将相应片段分别酶切, 用 T4 DNA 连接酶将片段 *snf1-up*、*KanR*、*snf1-down* 接起来获得 *SNF1* 基因敲除同源片段“*snf1-up-KanR-snf1-down*”, 并用引物对 F5/R6 扩增敲除同源片段, 大小约为 2 500 bp。

敲除同源片段构建过程中各片段的合成都采用高保真的 *pfu* DNA 聚合酶。

1.2.2 酵母细胞培养, 基因组提取和 PCR

参考文献[22–24]进行操作。

1.2.3 *SNF1* 基因和 *MIG1* 基因敲除同源片段的转化及克隆子筛选

采用 LiAc/SS-DNA/PEG 高效酵母转化法^[25], 将 *MIG1* 基因敲除同源片段转化至酿酒酵母 W32N55a 感受态细胞中。转化后的菌液涂布在含 100 μ g/mL 博来霉素的 YPD 平板 (酵母膏 2%、蛋白胨 2%, 葡萄糖 2%, 琼脂 2%) 上, 30 $^{\circ}$ C 培养 2–5 d 单菌落出现。将 *SNF1* 基因敲除同源片段转化至酿酒酵母 W32N55a 感受态细胞中。转化后的菌液涂布在含 200 μ g/mL G418 的 YPD (酵母膏 1%, 蛋白胨 2%, 葡萄糖 2%, 琼脂糖 2%) 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 2–5 d 单菌落出现。将 *SNF1* 基因敲除同源片段同时转化至已经敲除掉 *MIG1* 的

酿酒酵母 W32N55a (*mig1* Δ 0) 感受态细胞中, 转化后的菌液涂布在含 100 μ g/mL 的博来霉素和 200 μ g/mL G418 的 YPD 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 2–5 d 单菌落出现。

1.2.4 克隆子验证

将平板上出现的单菌落, 挑选至 YPD 液体培养中, 提取基因组, 用 *Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 验证。用引物对 F4/R4 验证 *MIG1* 基因敲除菌, 用引物对 F8/R8 验证 *SNF1* 基因敲除菌, 用这两对引物验证双敲菌株。

1.2.5 发酵实验

将亲本菌株和敲除菌株在相同的条件下进行代谢评价。发酵条件分别为: YP 培养基 (酵母膏 2%、蛋白胨 2%), 5% 混合糖和 10% 混合糖 (葡萄糖: 木糖=1:1), 30 $^{\circ}$ C, 初始接种量为 0.5 OD, 250 mL 三角瓶中发酵体系为 80 mL、200 r/min。

1.2.6 转录组测序和数据分析

按照 5% 混合糖发酵条件培养细胞, 取 9 h 处的细胞送至北京金唯智公司进行转录组测序并分析表达差异基因。基因功能注释和途径分析采用 SGD 的途径数据库 (<http://pathway.yeastgenome.org>)。YEASTRACT 在线数据库用来预测可能参与调控表达差异基因的关键转录因子^[26]。

1.2.7 葡萄糖、木糖、乙醇含量的测定

发酵液中的葡萄糖、木糖、乙醇含量利用 HPLC 进行测定。采用装有示差折光检测器的安捷伦 HPLC 检测仪器, 伯乐 Aminex HPX-87H 分析柱, 流动相使用 0.005 mol/L 硫酸, 流速为 0.6 mL/min, 温度 63 $^{\circ}$ C。

2 结果与分析

2.1 *SNF1* 和 *MIG1* 基因敲除菌的构建

2.1.1 同源重组 DNA 片段的构建

以酿酒酵母 W32N55a 基因组为模板, 用 PCR 分别扩增 *MIG1* 和 *SNF1* 基因上、下游同源臂片段, 结果如图 2A 所示; *ZeoR* 和 *KanR* 抗性基因片段结果如图 2B 所示; *SNF1* 基因敲除的同源片段“*snf1*-up-*KanR*-*snf1*-down”以及 *MIG1* 基因敲除的同源片段“*mig1*-up-*ZeoR*-*mig1*-down”结果如图 2C 所示。经过测序结果正确。这样, 获得的 DNA 片段可以用于相应目标基因的敲除。

2.1.2 克隆子验证

用引物对 F4/R4 进行 PCR 鉴定筛选出 W32N55a (*mig1* Δ 0) 的单克隆, 用引物对 F8/R8 进行 PCR 鉴定筛选出 W32N55a (*snf1* Δ 0) 和 W32N55a (*mig1*&*snf1* Δ 0) 的单克隆, 电泳结果如图 3 所示。这些结果表明目标突变菌株被成功构建。

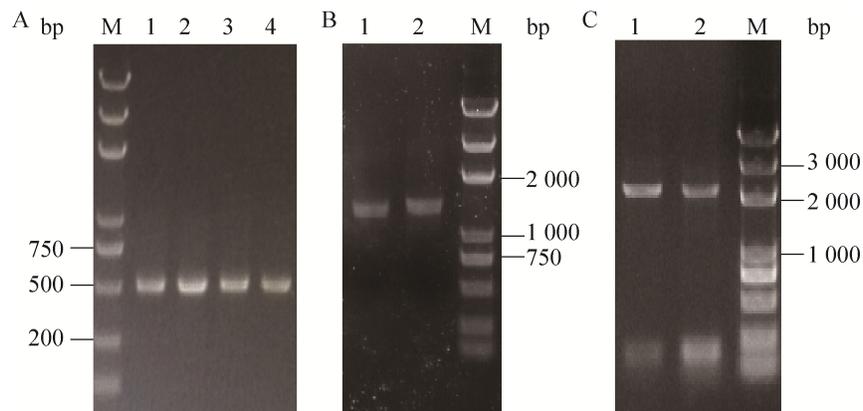


图 2 同源重组 DNA 片段的构建

Fig. 2 Construction of homologous recombination DNA fragments. (A) M: DNA marker; 1: *snf1*-up; 2: *snf1*-down; 3: *mig1*-up; 4: *mig1*-down. (B) M: DNA marker; 1: *ZeoR*; 2: *KanR*. (C) M: DNA marker; 1: *snf1*-up-*KanR*-*snf1*-down; 2: *mig1*-up-*ZeoR*-*mig1*-down.

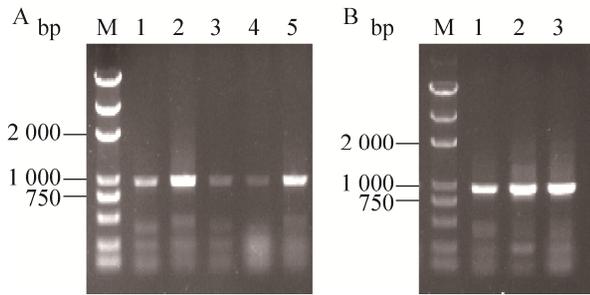


图3 阳性克隆子的验证

Fig. 3 Screening for positive clones. (A) M: marker; lane 1–2: W32N55a (*snf1Δ0*), PCR with primer F8 and R8; lane 3–5: W32N55a (*mig1Δ0*), PCR with primer F4 and R4. (B) M: marker; lane 1–3: W32N55a (*mig1&snf1Δ0*), PCR with primer F8 and R8.

2.2 发酵结果分析

对原始菌 W32N55a、单敲除菌株 W32N55a (*mig1Δ0*) 和 W32N55a (*snf1Δ0*)、双敲除菌株 W32N55a (*mig1&snf1Δ0*) 进行发酵,并测定发酵过程中发酵液葡萄糖、木糖、乙醇含量的变化。对于 5%混合糖中的葡萄糖消耗而言,从图 4A 的发酵曲线可以看出,与原始菌相比,*MIG1* 敲除菌降低,*SNF1* 敲除菌基本不变,双敲除菌显著加快。根据表 3 中的发酵参数比较,原始菌株的最大葡萄糖消耗速率和最大葡萄糖比消耗速率分别为 (3.05 ± 0.33) g/(L·h) 和 (2.65 ± 0.29) g/(L·h·OD),*MIG1* 敲除菌相应的发酵参数分别降低为原始菌株的 0.76 倍和 0.70 倍,而 *MIG1* 和 *SNF1* 双敲除菌相应的发酵参数分别提高到原始菌株的 1.28 倍和 1.24 倍。Klein 等曾报道^[27],*MIG1* 敲除菌的葡萄糖代谢能力下降,延滞期变长,导致混合糖的综合利用速度变慢。这与我们的结果相似。而且,*SNF1* 的敲除可能在某种程度上消除了 *MIG1* 敲除对葡萄糖消耗的负面影响,甚至让葡萄糖代谢更好。

对于 5%混合糖中的木糖利用而言,从图 4B 的发酵曲线可以看出,在 0–3 h 内,原始菌可以代谢木糖,似乎没有受到葡萄糖的抑制,当 3 h

以后,细胞似乎受到葡萄糖抑制效应的影响,不再代谢木糖,直到 9 h 以后才继续代谢木糖,此时混合糖中残余的葡萄糖只剩下约 3 g/L。与原始菌相比,*MIG1* 敲除菌对混合糖中木糖的利用表现类似的代谢趋势,表明 *MIG1* 的敲除对解除葡萄糖对木糖的抑制作用没有作用。而 *SNF1* 敲除菌的木糖利用在 6–9 h 没有停滞,表明 *SNF1* 的敲除可能有助于解除葡萄糖对木糖代谢的抑制作用。与 *SNF1* 敲除菌相似,*MIG1* 和 *SNF1* 双敲除菌木糖的利用在 6–9 h 没有明显的停滞,但木糖利用速率明显变慢,原始菌株的最大木糖消耗速率和最大木糖比消耗速率分别为 (2.23 ± 0.04) g/(L·h) 和 (1.94 ± 0.03) g/(L·h·OD) (表 3),双敲除菌的相应发酵参数降低为原始菌株的 0.44 倍和 0.43 倍,进一步说明葡萄糖对木糖抑制作用在某种程度上解除可能归功于 *SNF1* 的敲除而不是 *MIG1*;总体而言,该菌利用木糖的速度与原始菌株相比明显变慢。

对于 5%混合糖发酵最终的乙醇生产性能而言(图 4C),*MIG1* 敲除会降低代谢葡萄糖产生乙醇的速率,其最大乙醇生产速率和最大乙醇比生产速率分别降低为原始菌株的 0.80 倍和 0.74 倍。曾有研究表明,*MIG1* 敲除提高混合糖利用的能力有限,只有在特定的低水平葡萄糖条件下的限碳或限氮连续发酵中才能实现^[9–10]。在我们利用丰富氮源培养的条件下,没有观察到 *MIG1* 敲除对木糖代谢和混合糖利用的促进效应,这可能与所采用的发酵条件不同有关。由于葡萄糖和木糖利用的叠加效应,*SNF1* 敲除菌与原始菌相比乙醇的生产速率相当。*MIG1* 和 *SNF1* 双敲除菌的乙醇生产速率加快,最大乙醇生产速率和最大乙醇比生产速率分别提高到原始菌株的 1.08 倍和 1.11 倍,这可能与 *SNF1* 敲除后部分解除了葡萄糖对木糖利用的延滞同时促进了葡萄糖的代谢能力有关,*MIG1* 在其中的作用比较复杂,尚难以分

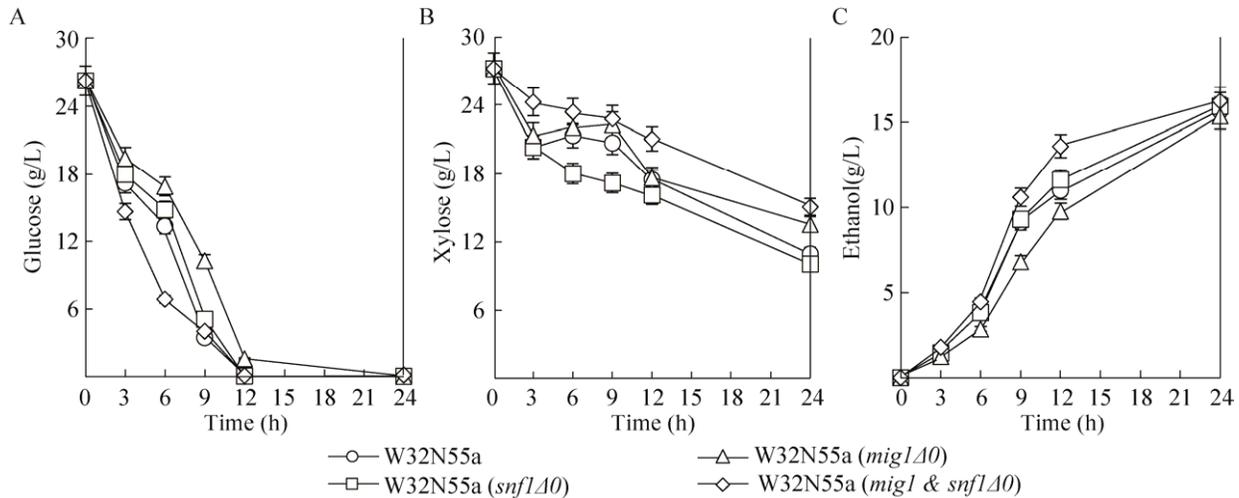


图 4 原始菌和敲除菌混合糖发酵

Fig. 4 Evaluation for mixed xylose and glucose fermentation. (A, B, C) glucose consumption, xylose consumption and ethanol production profiles using 5% mixed sugar. Data represent the mean and standard error of duplicate cultures grown on each source.

析。另外，对于最终糖醇转化率，即乙醇产率而言（表 3），敲除菌株与原始菌株之间并没有发现明显的差异。因此，*MIG1* 和 *SNF1* 的双敲除能够促进葡萄糖和木糖共利用，主要体现在提高混合糖产生乙醇的效率方面。

当将混合糖浓度提到 10% 时，与 5% 混合糖的发酵结果相比，敲除菌对发酵产生的影响程度明显降低。从表 3 中可以看出，敲除菌和原始菌的大部分发酵参数没有明显的差异，只有 *MIG1* 和 *SNF1* 双敲除的最大葡萄糖比消耗速率降低为原始菌株的 0.82 倍，而最大木糖比消耗速率提高到原始菌株的 1.23 倍。这个结果表明 *MIG1* 和 *SNF1* 的双敲除对葡萄糖和木糖共利用也受不同糖浓度的影响，具体的机理尚待研究。

2.3 转录组测序分析敲除菌的基因表达差异

为了从全基因组转录水平上解析 *MIG1* 和 *SNF1* 单敲除和双敲除对酵母共利用葡萄糖和木糖产生影响的可能原因，我们对 5% 混合糖发酵 9 h 的酵母细胞进行了转录组测序分析，并以相同发酵条件下的原始菌株 W32N55a 为对照，分析了

敲除菌中发生明显表达差异的基因，并结合 SGD 数据库的基因功能注释和途径分析（图 5），对这些基因可能影响的细胞代谢途径进行探究。与原始菌株比，敲除菌中发生明显表达差异的基因数量情况如下：*MIG1* 敲除菌有 12 个基因（上调表达的 8 个，下调表达的 4 个）；*SNF1* 敲除菌有 25 个（上调表达的 23 个，下调表达的 2 个）；*MIG1* 和 *SNF1* 双敲除菌株有 47 个（上调表达的 41 个，下调表达的 6 个）。其中，*MIG1* 敲除菌与 *MIG1* 和 *SNF1* 双敲除菌没有共享的表达上调基因，*SNF1* 敲除菌与 *MIG1* 和 *SNF1* 双敲除菌共享 20 个表达上调基因，*MIG1* 和 *SNF1* 双敲除菌特有 21 个表达上调基因。整体而言，*MIG1* 和 *SNF1* 的敲除导致更多的基因表达发生上调，也就是说这些基因的转录可能是受 *MIG1* 或（和）*SNF1* 直接或间接抑制的，敲除 *MIG1* 和 *SNF1* 则解除了这些抑制，从而使细胞更有利于共利用葡萄糖和木糖。

通过进一步考察表达差异基因的功能注释和途径分析，可以更清晰地了解在混合糖条件下可能受 *MIG1* 和 *SNF1* 调控的基因和途径。*MIG1*

敲除菌中上调和下调的基因功能如图 5B 所示。上调的基因与细胞壁成分、色氨酸的降解、细胞核 mRNA 输出、葡萄糖转运、热激转录因子、蛋白折叠、精氨酸吸收以及甘氨酸代谢有关, 这些基因可能直接或间接受 *MIG1* 的抑制。下调的基因与锌的转运、蛋白的合成和降解以及呼吸生长调控有关, 这些基因可能是直接或间接受 *MIG1* 的激活。需要注意的是, 编码低亲和力高转运性能的葡萄糖转运蛋白基因 *HXT1* 在 *MIG1* 敲除菌中表达上调。曾有报道指出^[28], *HXT1* 在葡萄糖浓度较低时被 Rgt1 阻遏, Mig1 并不是 *HXT1* 的调控蛋白, 另外, 其他葡萄糖转运蛋白基因 *HXT2/HXT3/HXT4* 是由 Mig1/Mig2 和 Rgt1 共同阻遏调控。由于 *MIG1* 敲除菌中只有 *HXT1* 表达上调, 而其他葡萄糖转运蛋白基因表达未发生明显变化, 意味着这一结果可能是由非 *MIG1* 敲除的因素造成的。重新审视基因组测序分析的取样点 (图 4A, 9 h) 时, 发现 *MIG1* 敲除菌的残留葡萄糖浓度为 10 g/L 左右, 明显高于原始菌株的 3 g/L 左右。因此, 与原始菌株相比, 高水平的残留葡

萄糖浓度可能造成了 *MIG1* 敲除菌中 *HXT1* 表达的解抑制。另外, 高水平的残留葡萄糖浓度还可能造成 *MIG1* 敲除对基因表达的影响被高水平残留葡萄糖的调控所掩盖, 其具体情况尚待研究。但是从分析混合糖条件下影响木糖代谢变化相关的基因表达差异的角度, 我们可以忽略葡萄糖残留浓度的影响, 而认为所有样品都是在有葡萄糖的情况下进行比较。

SNF1 敲除菌中明显上调表达的基因有 23 个, 其中 20 个基因在 *MIG1* 和 *SNF1* 双敲除菌中表达也明显上调 (图 5A), 而在 *MIG1* 敲除菌中表达没有发生明显变化 (图 5B)。这一比较结果说明这 20 个基因可能是受 Snf1 特异负调控, 而不受 Mig1 的调控。也就是说, 只要 *SNF1* 被敲除, 这 20 个基因的表达就会被解抑制。非常有趣的是, 这 20 个基因明显富集在与氨基酸 (主要包括精氨酸、脯氨酸和丝氨酸) 和其他氮源 (尿囊素、尿素和氨) 的吸收和降解相关的途径 (图 5C), 而这些基因是氮分解代谢物阻遏 (NCR) 基因, 受氮源的营养水平调控^[29-30]。精氨酸可以作为醇

表 3 原始菌和敲除菌发酵参数的比较

Table 3 Comparison of fermentation parameters between wild type and gene deletion strains

Conditions	5% mixed glucose and xylose				10% mixed glucose and xylose			
	WT	<i>mig1</i> Δ	<i>snf1</i> Δ	<i>mig1</i> & <i>snf1</i> Δ	WT	<i>mig1</i> Δ	<i>snf1</i> Δ	<i>mig1</i> & <i>snf1</i> Δ
Maximum glucose consumption rate, g/(L·h)	3.05±0.33	2.31±0.12	2.79±0.29	3.89±0.22	2.12±0.01	2.12±0.02	2.12±0.00	2.06±0.00
Maximum specific glucose consumption rate, g/(L·h·OD)	2.65±0.29	1.86±0.10	2.27±0.24	3.30±0.19	0.23±0.01	0.22±0.00	0.21±0.00	0.19±0.00
Maximum xylose consumption rate, g/(L·h)	2.23±0.04	1.95±0.19	2.31±0.01	0.98±0.01	0.71±0.01	0.80±0.01	0.90±0.01	0.76±0.01
Maximum specific xylose consumption rate, g/(L·h·OD)	1.94±0.03	1.58±0.15	1.88±0.01	0.83±0.00	0.07±0.00	0.08±0.00	0.09±0.00	0.08±0.00
Ethanol productivity, g/(L·h)	1.01±0.02	0.81±0.01	1.03±0.03	1.18±0.15	1.24±0.01	1.28±0.01	1.27±0.03	1.33±0.01
Specific ethanol productivity, g/(L·h·OD)	0.46±0.07	0.34±0.10	0.40±0.07	0.51±0.01	0.16±0.00	0.14±0.00	0.16±0.00	0.15±0.00
Ethanol yield, g/g	0.37±0.00	0.36±0.00	0.37±0.00	0.38±0.00	0.37±0.00	0.36±0.00	0.37±0.00	0.38±0.00

Data represent the mean and standard error of duplicate cultures grown on each source.

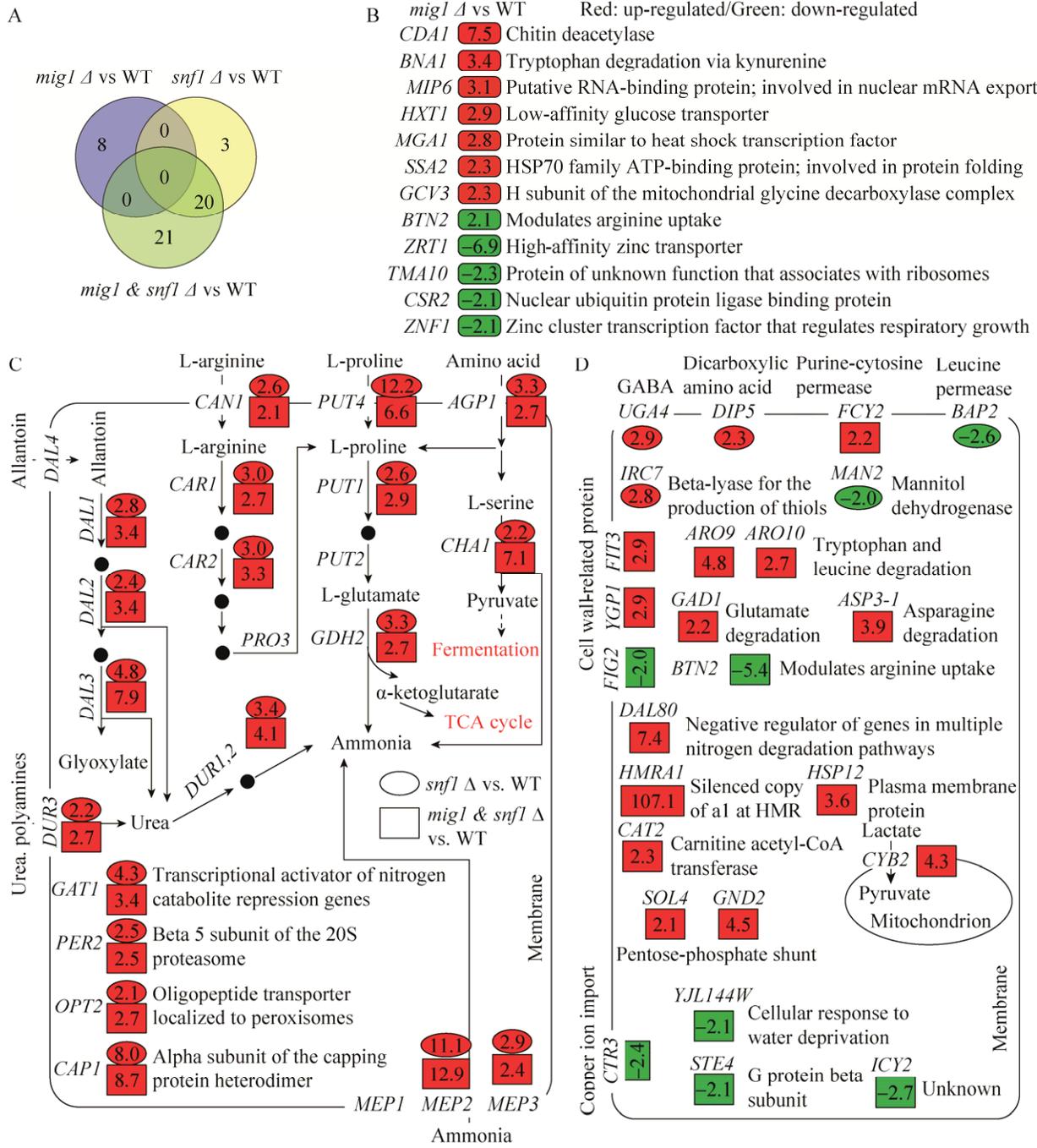


图 5 表达差异基因的功能和参与途径示意图

Fig. 5 Gene function and pathway mapping of differentially expressed genes. (A) Venn diagram among differentially expressed genes in W32N55a (*mig1* Δ), W32N55a (*snf1* Δ) and W32N55a (*mig1* Δ *snf1* Δ) by comparing with wild type strain W32N55a. (B) Up- and down-regulated genes in W32N55a (*mig1* Δ) compared with wild type strain W32N55a. (C) Overlapped up-regulated genes in W32N55a (*snf1* Δ) and W32N55a (*mig1* Δ *snf1* Δ) compared with wild type strain W32N55a. (D) Unique up- and down-regulated genes in W32N55a (*snf1* Δ) and W32N55a (*mig1* Δ *snf1* Δ) compared with wild type strain W32N55a. Red: up-regulated; Green: down-regulated.

母偏好的氮源,在 Can1、Car1 和 Car2 以及 Pro3 的作用下产生脯氨酸;脯氨酸由 Put4、Put1 和 Put2 的作用下转化为谷氨酸,再由 Gdh2 作用降解为氨和 α -酮戊二酸, α -酮戊二酸可以经由 TCA 循环进入碳中心代谢,而氨又可以进入氨基酸代谢。另外,丝氨酸在 Agp1 和 Cha1 的作用下降解为氨和丙酮酸,丙酮酸进入碳代谢途径进而生产乙醇。与原始菌株相比,SNF1 敲除菌可以更快利用木糖可能与胞内更丰富的氮源有关。综上所述,氮分解代谢物阻遏基因表达上调,可能更有利于细胞吸收更多的氮源,从而使细胞积累更多的氨,更有利于细胞的基础代谢,比如蛋白质合成前体——氨基酸的积累;同时这些氨基酸和氮源降解的产物又与碳中心代谢途径相连,可能影响细胞的糖代谢,其分子机理尚待研究。

在 MIG1 和 SNF1 双敲除菌中发现的 41 个表达上调的基因,除了在 SNF1 敲除菌中也发现表达上调的 20 个基因外,还有 21 个基因。这 21 个基因在 MIG1 敲除菌中表达未发生明显变化,说明这 21 个基因,可能是受 Snf1 和 Mig1 共同负调控的作用。也就是说,单独敲除 MIG1 和 SNF1 中的任何一个,都不会影响这 21 个基因的表达,当同时敲除这两个转录因子时,这 21 个基因的表达就会被解抑制。代谢途径分析没有发现明显的富集。不过,在 Snf1 调控功能缺失的基础上,MIG1 的敲除会进一步导致参与氨基酸吸收和降解途径的个别基因表达上调,包括 DIP5、BAP2、ARO9、ARO10、GAD1 和 ASP3-1 (图 5D)。另外,还包括磷酸戊糖途径中的 SOL4 和 GND2 以及参与线粒体丙酮酸合成的 CYB2,其他上调基因还包括一些与膜结构蛋白相关的基因。以上结果暗示,在 SNF1 敲除的基础上,MIG1 的敲除可能造成细胞对其他氨基酸氮源的偏好,同时影响到磷酸戊糖途径和线粒体丙酮酸代谢,从而造成细胞更倾向于快速利用葡萄糖,同时虽然木糖的利用

速度降低,但并不会受到抑制,表明葡萄糖对木糖代谢的抑制作用部分得到缓解,而且最终导致代谢混合糖积累乙醇的速度变快。

2.4 Mig1 和 Snf1 对差异表达基因的层级调控

利用 YEASTRACT 可以分析可能参与表达差异基因调控的转录因子,从而有助于解析在混合糖条件下 Mig1 和 Snf1 如何调控氨基酸和氮源代谢进而影响葡萄糖和木糖的共利用 (图 6)。结果发现 SNF1 敲除菌与 MIG1 和 SNF1 双敲除菌共有的 20 个表达上调基因均受 Gln3 调控 (P -value 小于 0.000 1);另外,GAT1 编码调控 NCR 基因表达的转录激活因子,其转录水平也上调。Gln3 和 Gat1 是 NCR 基因表达必需的转录激活因子,并且 Snf1 位于基因表达层级的上游来调控 Gln3 的活性^[31]。之前的诸多研究指出 Snf1 只在葡萄糖缺乏的条件下才起作用^[9,12]。然而 Nicastro 等最新的研究表明^[32],Snf1 可以在有葡萄糖存在的条件下起调控作用,SNF1 的敲除会造成细胞吸收和代谢氨基酸的能力加强,而且这种现象在葡萄糖浓度低 (2%) 的条件下比高浓度 (5%) 时更为明显。也就是说,即便在葡萄糖存在的条件下,Snf1 存在某种活性形式可以参与氨基酸和氮源代谢相关基因的抑制调控,这种相应的 Snf1 形式我们界定为 Snf1ⁱⁿ,在原始菌株中,混合糖条件下 Snf1ⁱⁿ 可能抑制 Gln3 的活性,从而抑制这些 NCR 基因的表达。相应地,受葡萄糖代谢影响的 Snf1 形式我们界定为 Snf1^{dp}。

另一方面,经过 YEASTRACT 分析,MIG1 和 SNF1 双敲除菌特有的 21 个表达上调基因均受 Gcn4 的调控,Gcn4 是参与调控氨基酸合成基因表达的转录激活因子。这 21 个基因的负调控可能是通过两条路径来实现,一条是经由不受葡萄糖代谢影响的 Snf1ⁱⁿ 形式,在原始菌株中,混合糖条件下 Snf1ⁱⁿ 会抑制 Gcn4 的活性,从而抑制这 21 个基因的表达;另一条是通过 Mig1 对这 21 个基

因的抑制作用, Snf1^{dp} 是 *Mig1* 上游层级的负调控因子, 在葡萄糖存在的条件下不具有活性。基于以上分析, *MIG1* 敲除菌中, 由于 Snf1^{in} 的存在, 会抑制 *Gln3* 和 *Gcn4* 的活性, 因此受这两个转录因子激活的基因水平不会发生变化; *SNF1* 敲除菌中, *Gln3* 和 *Gcn4* 的活性得到解抑制, 因此, 受 *Gln3* 激活的 20 个基因表达上调, 而受 *Gcn4* 激活的 21 个基因, 由于依然受 *Mig1* 的抑制, 其表达水平未发生明显变化; 当在 *SNF1* 双敲除菌中继续敲除 *MIG1* 时, *Mig1* 对这 21 个基因的抑制得到解除, 从而基因表达发生上调。至于以上层级调控的具体细节以及 Snf1^{in} 在葡萄糖存在条件下的形式尚待研究。

基于以上分析, 在混合糖发酵条件下, 一方面不受葡萄糖代谢影响的 Snf1^{in} 具有活性, 通过抑制转录激活因子 *Gln3* 和 *Gcn4* 的功能, 分别经由 Snf1^{in} -*Gln3* 和 Snf1^{in} -*Gcn4* 途径抑制两部分参与氨基酸吸收和降解等功能基因的表达; 另一方面, 由于葡萄糖的存在, 受葡萄糖代谢影响的 Snf1^{dp} 处于非活性状态, 不能够磷酸化失活 *Mig1*, 因此

Mig1 也可能抑制经由 Snf1^{in} -*Gcn4* 途径所抑制的那部分基因的表达, 其中包括磷酸戊糖途径氧化阶段两个基因——*SOL4* (6-磷酸葡萄糖酸内酯酶) 和 *GND2* (编码 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶) (图 6)。无论是单敲除 *SNF1* 还是双敲除 *SNF1* 和 *MIG1*, 与原始菌株相比, 木糖的利用在 3–9 h 之间都没有明显地被延滞 (图 4B), 而且只要 *SNF1* 被敲除, 经由 Snf1^{in} -*Gln3* 途径抑制的基因表达发生上调, 这表明经由 Snf1^{in} -*Gln3* 途径抑制的这些参与氨基酸吸收和降解功能的基因 (图 5、图 6), 其表达的解抑制是实现葡萄糖和木糖的同步利用所必需的。与单敲除 *SNF1* 相比, *SNF1* 和 *MIG1* 双敲除菌的葡萄糖代谢速率明显加快 (图 4A, 表 3), 而木糖代谢速率大大降低 (图 4B, 表 3), 与此同时, 由于 *MIG1* 也被敲除, 经由 Snf1^{in} -*Gcn4* 途径抑制的基因表达发生上调 (图 5、图 6), 说明这些基因很可能参与细胞对葡萄糖和木糖代谢流的控制。另外, *SNF1* 和 *MIG1* 双敲除能够加快乙醇的积累 (图 4C, 表 3), 从而改善葡萄糖和木糖的共利用, 这可能主要归功于葡萄糖

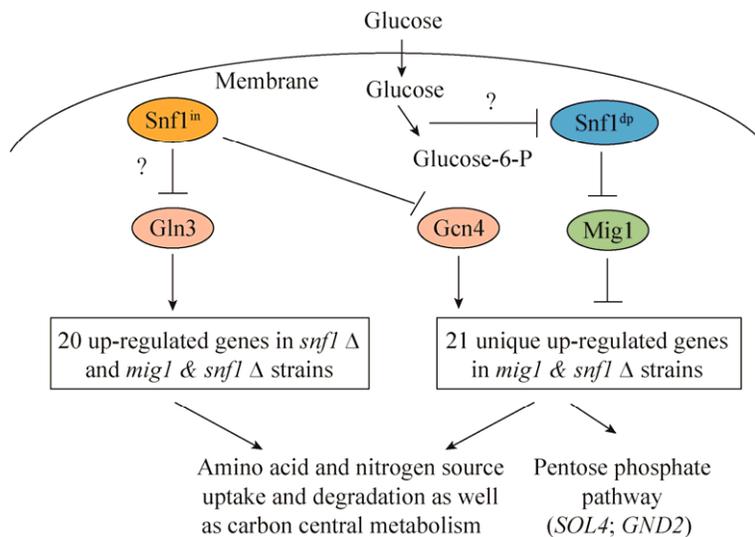


图 6 *Mig1* 和 *Snf1* 对表达差异的基因不同层级的调控

Fig. 6 *Mig1* and *Snf1* in a hierarchical regulatory network for regulating differentially expressed genes. Snf1^{in} : *Snf1* analog independent of glucose metabolism; Snf1^{dp} : *Snf1* analog dependent of glucose metabolism.

代谢能力的大幅度加快。虽然曾有研究表明^[7-8], 磷酸戊糖途径相关基因表达上调有利于促进木糖代谢, 但是在 *SNF1* 和 *MIG1* 双敲除菌中, 表达上调的 *SOLA* 和 *GND2* 以及其他经由 *Snf1^m-Gcn4* 途径抑制的基因所起的作用依然有待进一步研究。

3 结论

以酿酒酵母工程菌株 W32N55a 为出发菌株, 通过同源重组技术分别对葡萄糖阻遏效应中的关键基因 *SNF1* 和 *MIG1* 基因进行单敲除和双敲除, 评价了敲除菌株共利用葡萄糖和木糖的性能。在低浓度混合糖条件下 *MIG1* 单敲除对混合糖的共利用影响不大, *SNF1* 单敲除明显提高了木糖的利用效率, *MIG1* 和 *SNF1* 双敲除明显促进葡萄糖的利用效率同时可以以较慢的速度共利用木糖, 从而积累乙醇的效率得到提高; 当混合糖浓度提高到 10% 时, *MIG1* 和 *SNF1* 的单敲除效应变得不明显, *MIG1* 和 *SNF1* 双敲除的效应依然很明显, 但影响程度已经明显低于低浓度混合糖的情况。我们利用转录组测序技术分析了在低浓度混合糖条件下 *MIG1* 和 *SNF1* 单敲除和双敲除对全基因组水平上基因表达谱的影响。*SNF1* 单敲除后, 一些氮分解代谢物阻遏基因表达明显上调, 这可能是导致 *SNF1* 单敲除菌利用木糖效率提高的主要原因。*MIG1* 和 *SNF1* 双敲除菌除了上述 *SNF1* 单敲除对转录组产生的影响外, 还会进一步导致参与氨基酸分解代谢相关的基因表达上调, 可能是造成双敲除菌倾向于更快利用葡萄糖但同时可以共利用木糖的主要原因。我们的研究结果暗示了 *Snf1* 可能以依赖于葡萄糖代谢和不依赖于葡萄糖代谢这两种形式参与 NCR 基因的层级调控, 这些研究发现将有助于进一步提高酿酒酵母工程菌共利用葡萄糖和木糖的效率。

REFERENCES

- [1] Somerville C, Bauer S, Brininstool G, et al. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*, 2004, 306(5705): 2206–2211.
- [2] Chundawat SPS, Beckham GT, Himmel ME, et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2011, 2: 121–145.
- [3] Yu JD, Cai JP, Geng XL, et al. Characteristics of mixed sugar fermentation by *Candida maltosa*. *Biotech World*, 2013, (1): 2–3 (in Chinese). 于佳动, 蔡静平, 耿笑林, 等. 麦芽糖假丝酵母菌混合糖代谢的发酵特性. *生物技术世界*, 2013, (1): 2–3.
- [4] Kim SR, Ha SJ, Wei N, et al. Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: a promising strategy for producing cellulosic ethanol. *Trends Biotechnol*, 2012, 30(5): 274–282.
- [5] Hsiao HY, Chiang LC, Ueng PP, et al. Sequential utilization of mixed monosaccharides by yeasts. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 43(4): 840–845.
- [6] Sedlak M, Ho NWY. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. *Yeast*, 2004, 21(8): 671–684.
- [7] Wahlbom CF, Cordero Otero RR, van Zyl WH, et al. Molecular analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with improved ability to utilize xylose shows enhanced expression of proteins involved in transport, initial xylose metabolism, and the pentose phosphate pathway. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(2): 740–746.
- [8] de Figueiredo Vilela L, de Araujo VPG, de Sousa Paredes R, et al. Enhanced xylose fermentation and ethanol production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. *AMB Express*, 2015, 5(1): 16.
- [9] Roca C, Haack MB, Olsson L. Engineering of carbon catabolite repression in recombinant xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 63(5): 578–583.
- [10] Thanvanthri Gururajan V, Gorwa-Grauslund MF, Hahn-Hägerdal B, et al. A constitutive catabolite repression mutant of a recombinant *Saccharomyces*

- cerevisiae* strain improves xylose consumption during fermentation. *Ann Microbiol*, 2007, 57(1): 85–92.
- [11] Shen Y, Hou J, Bao XM. Enhanced xylose fermentation capacity related to an altered glucose sensing and repression network in a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioengineered*, 2013, 4(6): 435–437.
- [12] Krahulec S, Petschacher B, Wallner M, et al. Fermentation of mixed glucose-xylose substrates by engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*: role of the coenzyme specificity of xylose reductase, and effect of glucose on xylose utilization. *Microb Cell Fact*, 2010, 9(1): 16.
- [13] Zaman S, Lippman SI, Zhao X, et al. How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet*, 2008, 42: 27–81.
- [14] Christensen TS, Oliveira AP, Nielsen J. Reconstruction and logical modeling of glucose repression signaling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Syst Biol*, 2009, 3(1): 7.
- [15] Rødkær SV, Færgeman NJ. Glucose- and nitrogen sensing and regulatory mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 2014, 14(5): 683–696.
- [16] Conrad M, Schothorst J, Kankipati HN, et al. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, 2014, 38(2): 254–299.
- [17] Klein CJL, Olsson L, Nielsen J. Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of *MIG1* in metabolic functions. *Microbiology*, 1998, 144(1): 13–24.
- [18] Gancedo JM. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(2): 334–361.
- [19] García-Salcedo R, Lubitz T, Beltran G, et al. Glucose de-repression by yeast AMP-activated protein kinase *SNF1* is controlled via at least two independent steps. *FEBS J*, 2014, 281(7): 1901–1917.
- [20] Simpson-Lavy KJ, Johnston M. SUMOylation regulates the *SNF1* protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(43): 17432–17437.
- [21] De Vit MJ, Waddle JA, Johnston M. Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol Biol Cell*, 1997, 8(8): 1603–1618.
- [22] Treitel MA, Kuchin S, Carlson M. Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1998, 18(11): 6273–6280.
- [23] Liao XS, Butow RA. *RTG1* and *RTG2*: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell*, 1993, 72(1): 61–71.
- [24] Vanderauwera S, Vandenbroucke K, Inzé A, et al. AtWRKY15 perturbation abolishes the mitochondrial stress response that steers osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(49): 20113–20118.
- [25] Gietz RD, Schiestl TH. Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc*, 2007, 2(1): 38–41.
- [26] Teixeira MC, Monteiro PT, Guerreiro JF, et al. The YEASTRACT database: an upgraded information system for the analysis of gene and genomic transcription regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(D1): D161–D166.
- [27] Klein CJL, Rasmussen JJ, Rønnow B, et al. Investigation of the impact of *MIG1* and *MIG2* on the physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol*, 1999, 68(2/3): 197–212.
- [28] Kaniak A, Xue ZX, Macool D, et al. Regulatory network connecting two glucose signal transduction pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 2004, 3(1): 221–231.
- [29] Ljungdahl PO, Daignan-Fornier B. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2012, 190(3): 885–929.
- [30] Hofman-Bang J. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biotechnol*, 1999, 12(1): 35–74.
- [31] Bertram PG, Choi JH, Carvalho J, et al. Convergence of TOR-nitrogen and Snf1-glucose signaling pathways onto Gln3. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(4): 1246–1252.
- [32] Nicastro R, Tripodi F, Guzzi C, et al. Enhanced amino acid utilization sustains growth of cells lacking Snf1/AMPK. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853(7): 1615–1625.

(本文责编 郝丽芳)