

# グリセロール生産菌Candida versatilis SN-18におけるグリセロール生成機構の解明

誌名	応用糖質科学：日本応用糖質科学会誌 = Bulletin of applied glycoscience
ISSN	21856427
著者名	水島,大貴 石川,浩介 石牧,優規 伏屋,瑞季 春見,隆文
発行元	日本応用糖質科学会
巻/号	8巻3号
掲載ページ	p. 211-216
発行年月	2018年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat





第6回応用糖質フレッシュシンポジウム

The Study of the Glycerol Production Mechanism in *Candida versatilis* SN-18, Glycerol Production Yeast\*

## グリセロール生産菌 *Candida versatilis* SN-18 におけるグリセロール生成機構の解明\*

<sup>1</sup> 日本大学生物資源科学部生命化学科

<sup>2</sup> 帯広畜産大学原虫病研究センター

水島大貴<sup>1,2,\*\*</sup>, 石川浩介<sup>1</sup>, 石牧優規<sup>1</sup>,  
伏屋瑞季<sup>1</sup>, 春見隆文<sup>1</sup>

(みずしま だいき, いしかわ こうすけ, いしまき ゆうき,  
ふしや みずき, かすみ たかふみ)

<sup>1</sup> Department of Chemistry and Life Sciences, Nihon University

<sup>2</sup> National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of  
Agriculture and Veterinary Medicine

Daiki Mizushima,<sup>1,2,\*\*</sup> Kosuke Ishikawa,<sup>1</sup> Yuki Ishimaki,<sup>1</sup>  
Mizuki Fushiya,<sup>1</sup> and Takafumi Kasumi<sup>1</sup>

**要旨:** 微生物発酵によるグリセロール生産を目指し、グリセロール生産菌 *Candida versatilis* SN-18 の高糖濃度条件下におけるグリセロール生成機構を解析した。本酵母は、浸透圧ストレス条件下のグリセロール生成に必須である glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPD) をコードする *Cvcpd1* および *Cvcpd2* を有しており、それらはゲノム DNA 上に直列かつ近接して存在していた。*Cvcpd2* は溶質の種類にかかわらず常に一定の発現を示した。一方、*Cvcpd1* は NaCl 存在下では直ちに転写が誘導されるのに対し、20% グルコース存在下では培養 72 時間までに徐々に誘導された。いずれも *Cvcpd1* の誘導に伴ってグリセロール生産量が増加したことから、*Cvcpd1* が本酵母のグリセロール生産に重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、それらの結果は、溶質の種類や培養時間の増加によってもグリセロール生産が制御されていることも示した。本研究で明らかになった本酵母のグリセロール生成機構は、これまでの浸透圧ストレスと関連付けたグリセロール生成機構とは異なる機構の存在を示唆した。

**キーワード:** グリセロール, 浸透圧ストレス, グリセロール 3-リン酸脱水素酵素, 高糖濃度, *Candida versatilis*\*\*\*

### 1. はじめに

グリセロールは、医薬品や食品、化成品等の原料として利用されている。現在、その製造は高純度に精製できる化学合成法や植物油からの精製により行われているが、過去には微生物発酵による製造も行われていた<sup>1)</sup>。数多くの微生物でグリセロールを生成することが報告されており、それらの中でも特に研究されているのが、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* である。*S. cerevisiae* は、増殖培地のような富栄養な環境下でもグリセロールを生成するが、大量の塩や糖類が培地中に存在するときにはその生成速度や生成量が急激に上昇する。このグリセロール生成の促進は、酵母の細胞内外の溶質濃度差によって生じる浸透圧ストレスが起因しており、その機構は分子生物学的に明らかとなっている。筆者らは、*S. cerevisiae* よりグリセロール

生産性に優れた *Candida versatilis* SN-18 を用いた微生物発酵によるグリセロール生産の実用化を目指している。そのため、*C. versatilis* SN-18 のグリセロール生産に適した培養条件を検討するとともに代謝工学的制御のターゲットとなるグリセロール生産に重要な因子を特定することも念頭に、*C. versatilis* SN-18 のグリセロール生成機構の解析も行ってきた。本研究では、浸透圧耐性酵母 *C. versatilis* SN-18 におけるグリセロールの高生産培養条件の確立の一環として、高糖濃度条件下におけるグリセロール生成機構につき、遺伝子・タンパク質の発現動態と浸透圧ストレス応答との関連性を明らかにした。

### 2. *C. versatilis* SN-18 のグリセロール生産

*C. versatilis* SN-18 は、60% (w/v) グルコース溶液のよ

\* 本原稿は、日本応用糖質科学会第6回応用糖質フレッシュシンポジウム (2017) で一部発表された。

\*\* 連絡先 (Tel. 0155-49-5885, Fax. 0155-49-5229, E-mail: dmizushima@obihiro.ac.jp)

\*\*\* Key words: glycerol, osmotic stress, glycerol 3-phosphate dehydrogenase, high glucose concentration, *Candida versatilis*

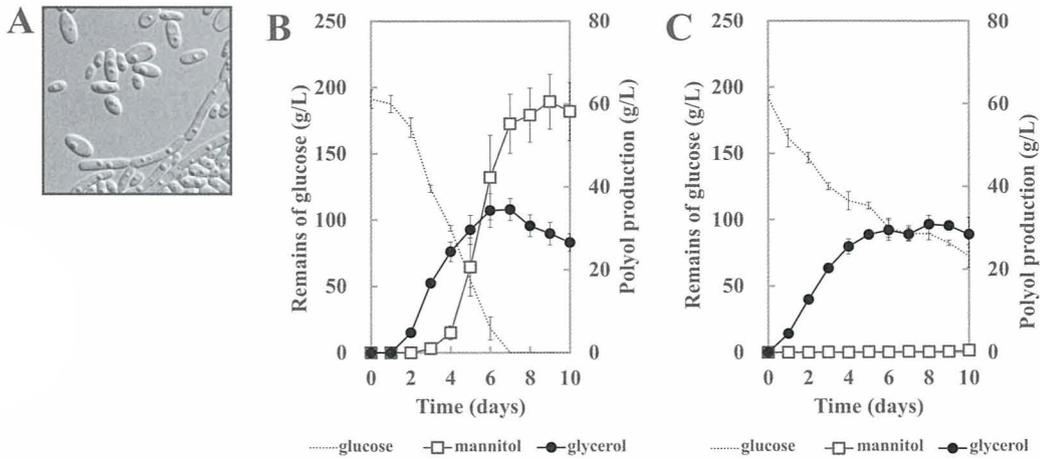


図1. 高糖濃度条件下における *Candida versatilis* SN-18 のグリセロール生産  
*Candida versatilis* SN-18 (A) を 20% (w/v) グルコース, 1% (w/v) 酵母エキス (B) およびそれに 0.5% 硫酸アンモニウムを加えた培地 (C) を用いて培養したときのグリセロールとマンニトール生産量およびグルコース残存量を示す. 糖アルコールおよびグルコースの定量は, HPAEC-PAD により定量した. エラーバーは標準偏差 ( $n = 3$ ) を示す.

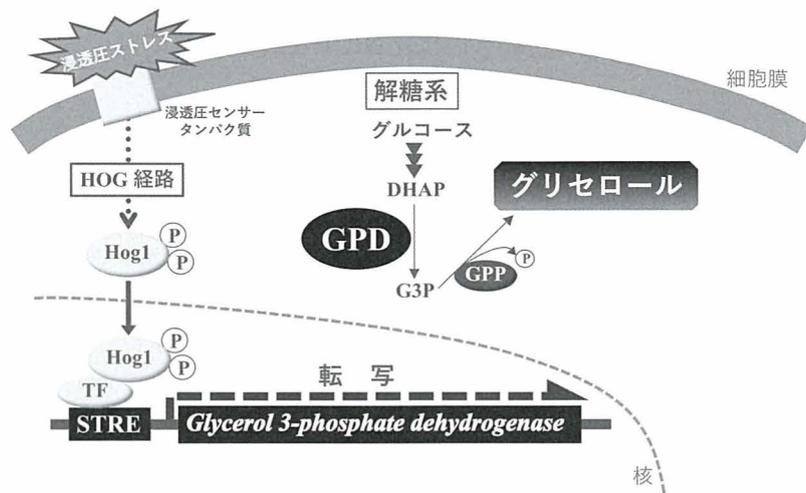


図2. 浸透圧ストレスと関連付けられたグリセロール生成機構

うな浸透圧ストレス条件下でも生育可能な酵母である (図1(A))<sup>4,5)</sup>. さらに, 20%グルコースおよび1% (w/v) 酵母エキスという単純な培地組成で約40 g/Lのグリセロールを生産することから, 微生物発酵によるグリセロール生産の実用化が期待されている菌株である (図1(B)). しかし, 本酵母のグリセロール生産は培養後期になると上昇せず, 40 g/L以上の生産量が望めない. この原因は, 培養後期に消費されるグルコースが多量のマンニトール生産へ代謝変換されることにあると推察されたため, マンニトール生産を抑制することがグリセロール生産量の増加に繋がると期待された. そこで, 種々の培養条件および培地組成を検討し, それらの中で硫酸アンモニウムの添加がマンニトール生産を抑制することを見出した. そして, その生産を完全に抑制する培養条件を確立したが, グリセロール生産量は増加しなかった (図1(C)). これは, 本菌のマンニトール生成系に供給されていたグルコースが必ずしもグリセロール生成系に供給されるわけではないことを示唆するものとなった. この結果を受け, 本菌のグリセロール生産性を向上させるためには, グリセロール生成系の酵素

の改変や代謝工学的な制御が有効であると考え, 高糖濃度条件下における本菌のグリセロール生成の基本的メカニズムを理解することが必要となった.

グリセロール生成機構は, *S. cerevisiae* をモデル生物として解析されており, 浸透圧ストレス耐性と密接に関係していることが明らかとなっている (図2). *S. cerevisiae* は, 高溶質濃度環境下に曝されると, 細胞内外の溶質濃度差によって生じる浸透圧を解消するために細胞内にグリセロールを多量に生成する. グリセロールは, 解糖系の中間代謝産物であるジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) がNADH依存型 glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPD) によって還元されてグリセロール 3-リン酸 (G3P) へ変換された後, それが glycerol 3-phosphate phosphatase (GPP) によって脱リン酸化されることで生成される<sup>6-12)</sup>. GPDおよびGPPをコードする遺伝子は mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードの1つである High osmolarity glycerol (HOG) 経路によって制御されており, 転写因子と複合体を形成した MAP Kinase Hog1 がそれらの転写制御領域に存在する stress response element (STRE) 配列に結合し, 転

写が誘導されることでグリセロール生成が促進される<sup>13-17)</sup>。また、*GPD* および *GPP* にはそれぞれ2つの相同遺伝子 (*GPD1*, *GPD2* および *GPP1*, *GPP2*) が存在し、それぞれがグリセロール生成において同じ機能を有する。しかし、それらの転写誘導の条件が異なっている。*GPD2* と *GPP1* は、嫌気的条件下における細胞内のレドックスバランスを維持するために誘導される<sup>8,10,11)</sup>。一方で、*GPD1* と *GPP2* は、浸透圧ストレスによって誘導されるが、その際、*GPD* の発現に依存してグリセロールが生成されることから、*GPD* が鍵酵素とされている<sup>6,9)</sup>。

### 3. *C. versatilis* SN-18 における *GPD* の取得と機能解析

*S. cerevisiae* において、グリセロール生成は、*GPD* をコードする遺伝子が浸透圧ストレスによって転写誘導されることで促進されるという機構が明らかとなっている。この知見は、*C. versatilis* SN-18 においても同様に、高糖濃度によって生じる浸透圧ストレスが *C. versatilis* SN-18 由来 *GPD* を転写誘導することでグリセロール生成が促進されるという機構を有していることを予測させた。この予測に基づき、まず *C. versatilis* SN-18 由来 *GPD* の単離を試みた。

縮重プライマーを用いた PCR、染色体歩行法、3'RACE 法を用いて、本酵母における2つの相同遺伝子 *Cvcpd1*, *Cvcpd2* を取得した。染色体歩行法により、両遺伝子が同一染色体上で直列に存在するとともに、それぞれの5'上流にストレス応答に関わる STRE 配列の存在も明らかにした(図3)<sup>19)</sup>。*S. cerevisiae* は、STRE が転写制御領域に存在し浸透圧ストレスによって誘導される *GPD1* と、STRE が転写制御領域に存在せず嫌気条件下で転写誘導される *GPD2* を有しているが<sup>6,10)</sup>、本酵母のように相同遺伝子が直列には位置せず、それぞれ異なる染色体上に存在していることが報告されている<sup>19,20)</sup>。また、工業スケールのグリセロールを生産する *Candida glycerinogenes*<sup>21,22)</sup>、*Candida magnoliae*<sup>23,24)</sup> は *GPD* が1つだけであるのに対し、*S. cerevisiae* のように *GPD* を2つ有している耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* においても、そのような報告はない<sup>25,26)</sup>。本研究で明らかとなった同一染色体上に2つの *GPD* が直列に位置していることは新たな知見である。一方で、*S. cerevisiae* だけでなく *C. glycerinogenes* の *GPD* の転写制御領域にも STRE 配列が存在することや<sup>22)</sup>、*C. glyce-*

*erinogenes*, *C. albicans*, *C. versatilis* NBRC 10650 や *D. hansenii* の *GPD* も浸透圧ストレスによってその発現量が上昇することが報告されている<sup>22,27-29)</sup>。これらのことから、*Cvcpd1*, *Cvcpd2* が、20% グルコースのような浸透圧ストレス条件下における *C. versatilis* SN-18 のグリセロール生産に関与していることは明らかであり、直列に位置することがそれに強く寄与していることが考えられた。

ドメイン構造解析により、*Cvcpd1* および *Cvcpd2* の推定アミノ酸配列が多くの菌種の *GPD* に共通の N-terminal NAD<sup>+</sup> binding domain と C-terminal substrate binding domain を有することや、補酵素である NAD<sup>+</sup> の結合部位である NAD<sup>+</sup> binding motif を完全に保存していることが明らかになった<sup>18)</sup>。さらに、両遺伝子が *GPD* として機能するタンパク質をコードし、それらがグリセロール生成に関与しているかどうかを解析するため、*S. cerevisiae* *GPD* 破壊株を用いた異種発現系により解析した。*Cvcpd1* 導入株は、0.5 M KCl, 0.5 M NaCl, 1.0 M ソルビトール, 1.0 M グルコースを含む YPD 平板培地上でコントロール株を上回る生育を示した(図4(A))。一方、*Cvcpd2* 導入株は、いずれの平板培地上においてもコントロール株および *Cvcpd1* 導入株を遥かに上回る生育を示した(図4(A))。さらに、それらの細胞内グリセロール蓄積量は、生育試験の結果と同様に、*Cvcpd2* 導入株が最も高い値を示した(図4(B))。加えて、*CvGPD2* が *CvGPD1* より有意に高い *GPD* 活性を有することも明らかになった(図4(C))<sup>19)</sup>。これらの結果は、他の *Candida* 属酵母の *GPD* 遺伝子を導入した *S. cerevisiae* が、浸透圧ストレス条件下で生育が復帰するとともに細胞内に大量のグリセロールを生成・蓄積するという既存の報告とも一致するため<sup>22,24)</sup>、*Cvcpd1*, *Cvcpd2* がコードするタンパク質がグリセロール生成に関与していることが明らかになった。

### 4. 浸透圧ストレス条件下における *Cvcpd* とグリセロール生成の関係性

*S. cerevisiae* では、溶質の種類に関わらず高濃度の塩類や糖類による浸透圧ストレスによって *Scgpd1* が転写誘導されることで、グリセロール生成が促進されるという報告がなされている<sup>7,9)</sup>。そのため、*Cvcpd* の存在が明らかとなった *C. versatilis* SN-18 においても同様の機構が予測された。そこで、本菌の浸透圧ストレス条件下における2つの *Cvcpd* の発現動態を半定量 RT-PCR、そのときのグリセ

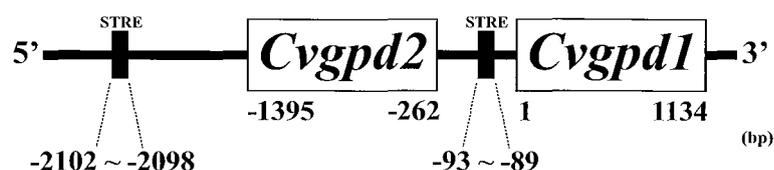


図3. 直列に位置する *Cvcpd*

ゲノム DNA 上に直列に存在する *Cvcpd1* および *Cvcpd2* のそれぞれの上流に、STRE 配列 (■) が存在した。

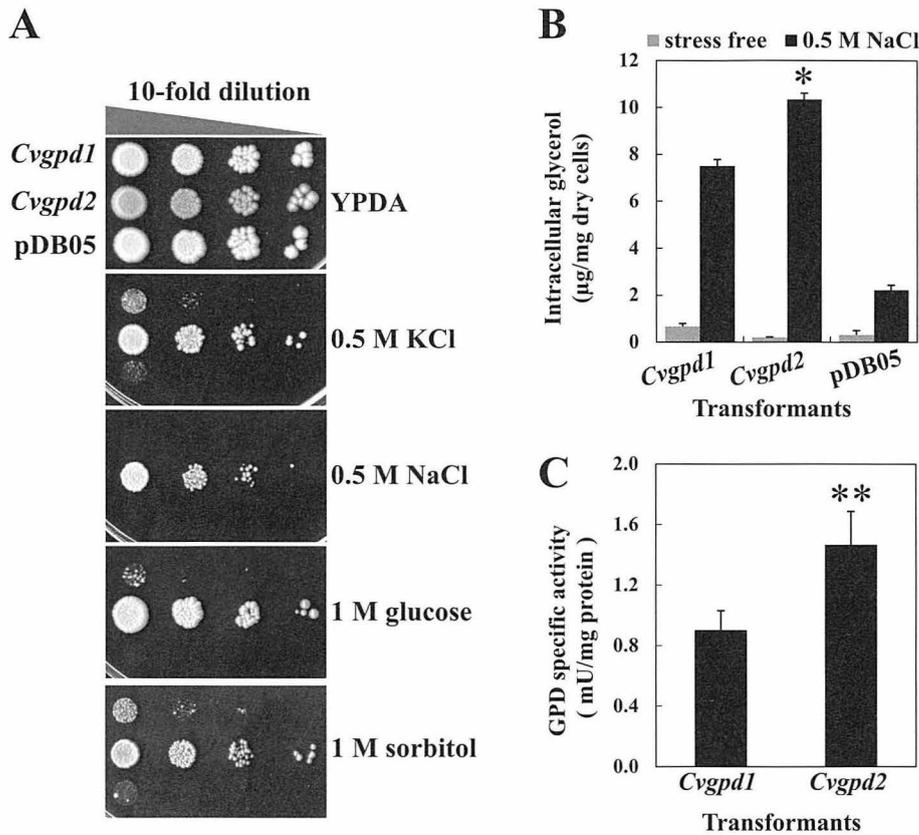


図4. *Saccharomyces cerevisiae* *gpd* 欠損株を用いた *Cvvpd1* および *Cvvpd2* の機能解析

*S. cerevisiae* BY4741 *gpd1Δgpd2Δ* に *Cvvpd1* および *Cvvpd2* がそれぞれ組み込まれた pDB05 ベクターを形質転換した. 浸透圧ストレス条件下における各導入株の耐性試験 (A), 細胞内グリセロール蓄積量 (B) および GPD 活性 (C). エラーバーは標準偏差 ( $n = 3$ ) を示す. \* $P < 0.01$  (Bonferroni method), \*\* $P < 0.05$  (Student's *t*-test).

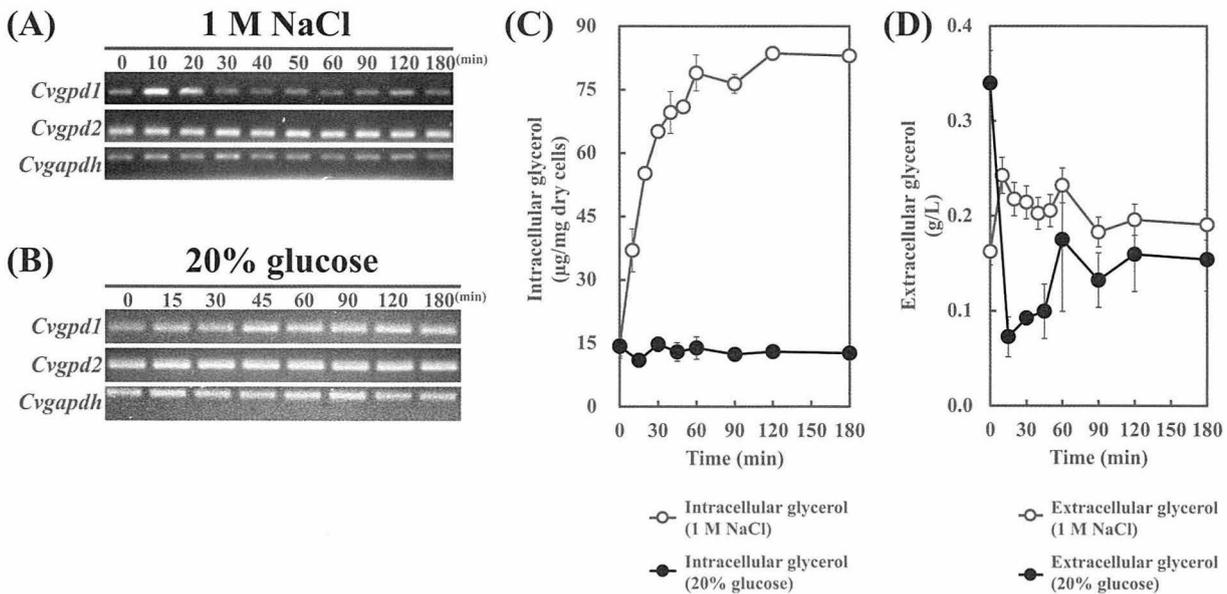


図5. 短時間 (3 時間) の浸透圧ストレスによる *Cvvpd*s 発現動態とグリセロール生成量の比較解析

1 M NaCl (A) および 20% グルコース条件下 (B) における培養 3 時間までの *Cvvpd*s と *Cvgapdh* の発現動態を半定量的 RT-PCR により解析した. 細胞内 (C) および細胞外 (D) のグリセロール量は HPAEC-PAD により定量した. エラーバーは標準偏差 ( $n = 3$ ) を示す.

ロール生成量をイオン交換クロマトグラフィーにより定量し, その関係性を明らかにすることとした. 1 M NaCl 存在下のような浸透圧ストレス条件下において, *Cvvpd1* はストレス負荷後 10 分までに転写誘導され (図 5(A)), それに伴って細胞内グリセロール蓄積量も上昇した (図 5(C)).

一方で, *Cvvpd2* が培養 3 時間まで常に一定の発現を示したことから (図 5(A)), 直列に並ぶ両遺伝子はそれぞれが独立して制御されることでグリセロール生成に関与していることを示した. 特に, 1 M NaCl 存在下における本菌のグリセロール生成には, *Cvvpd1* が関与することが明らか

となった。しかし、20% グルコース存在下においては、両遺伝子の発現量はともに、培養3時間まで大きな変動はなく、細胞内グリセロール蓄積量と細胞外グリセロール生成量の顕著な増加も見られなかった (図5(B), (C), (D))。

以上の結果に加え、20% (1.1 M) グルコースの浸透圧と等しくなるように糖類 (グルコース, ソルビトール), 塩類 (NaCl, KCl) をそれぞれ加えた培地で培養したとき、本酵母の細胞内グリセロール蓄積量は、塩類を加えた培地のみで明らかに増加した (図6)。このことから、グリセロール生成の制御は糖類と塩類で異なることを示し、糖類による浸透圧ストレスでは、3時間程度の短時間の培養においては、*Cvgapd1* が転写誘導されないためグリセロール

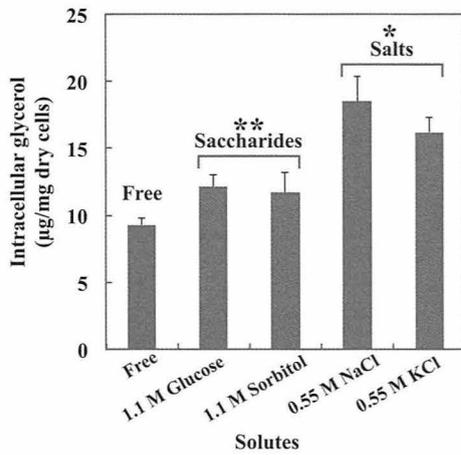


図6. 溶質の種類が *C. versatilis* SN-18 のグリセロール生成に及ぼす影響

1.1 M (20%) グルコースの浸透圧と等しくなるように、1.1 M ソルビトール、0.55 M NaCl、0.55 M KCl が添加された培地で、*C. versatilis* SN-18 を培養した。エラーバーは標準偏差 ( $n = 3$ ) を示す。  $P < 0.05$  (Bonferroni method, \*無添加と比較, \*\*塩類と比較)。

生成も促進されないことが推測された。実際に20% グルコース存在下では、グリセロール生成量は培養48時間目から増加していることを考慮すると、グリセロール生成が浸透圧ストレス以外の要因によっても誘導されていることが考えられることや、*S. cerevisiae* の代謝が高糖濃度存在下ではクラブツリー効果によって劇的に変化することが知られていることから<sup>30</sup>、本菌のグリセロール生成の誘導が培養時間もしくはグルコース濃度によっても制御されていることが推測された。そこで、本酵母を2% グルコースおよび20% グルコース存在下で72時間培養し、*Cvgapd1*、*Cvgapd2* の発現量とグリセロール生成量の動態を比較解析した (図7)。2% グルコース存在下においては、*Cvgapd1*、*Cvgapd2* の発現量は、リファレンス遺伝子の *Cvgapdh* と類似した動態を示した (図7(A))。一方で、20% グルコース存在下においては、*Cvgapd1* の発現量のみが培養36時間以降から徐々に上昇し、それに伴って、細胞外グリセロール濃度が上昇した。2% グルコース存在時の細胞外グリセロール濃度 (7.4 g/L) と比較して、20% グルコース存在時の細胞外グリセロール濃度 (22.1 g/L) が約3倍に上昇していた (図7(B), (D))。さらに、細胞内グリセロール量と両遺伝子の発現動態には負の相関性が見られた (図7(B), (C))。これらの結果から、本酵母のグリセロール生成は、20% グルコース存在下で24時間から36時間培養し、*Cvgapd1* が転写誘導されることで促進されることが明らかになった。すなわち、高糖濃度存在下における本酵母のグリセロール生成は、浸透圧ストレスだけでなく培養時間の経過や、生育に過剰量のグルコースの影響によっても誘導されることが示唆された。

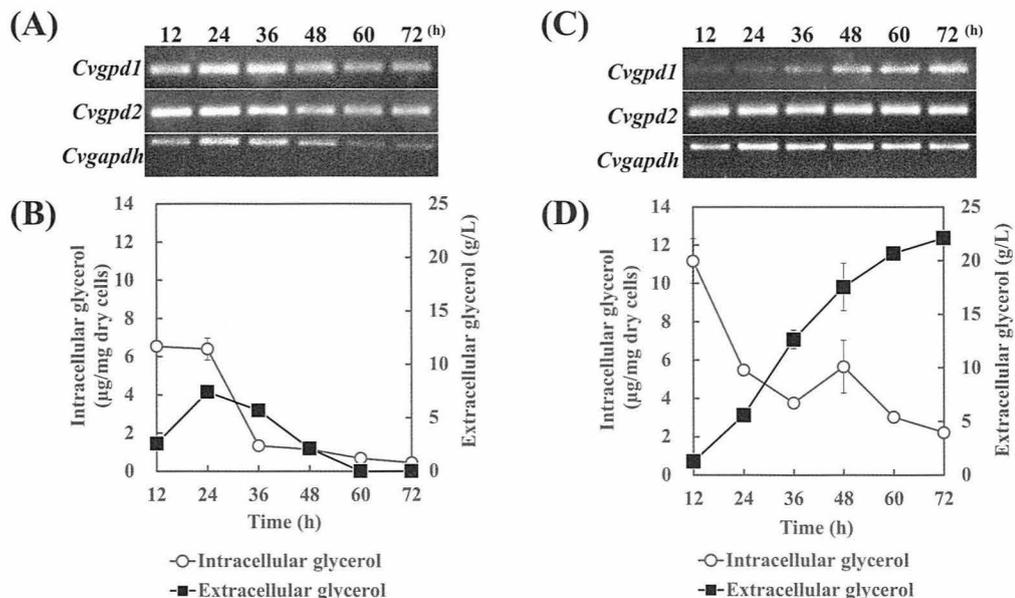


図7. 長時間 (72時間) の浸透圧ストレスによる *Cvgapds* 発現動態とグリセロール生成量の比較解析

2% グルコース (A) および20% グルコース条件下 (C) における培養72時間までの *Cvgapds* と *Cvgapdh* の発現動態を半定量的 RT-PCR により解析した。2% グルコース条件下における細胞内外のグリセロール量 (B) および20% グルコース条件下における細胞内外のグリセロール量 (D) は HPAEC-PAD により定量した。エラーバーは標準偏差 ( $n = 3$ ) を示す。

## 5. おわりに

本研究では、高糖濃度条件下における *C. versatilis* SN-18 のグリセロール生成機構を解析し、グリセロール生成の鍵酵素である GPD をコードする *Cvgpd1* が重要な役割を果たしていることを明らかにした。これまで、グリセロール生成機構は、溶質の種類に関わらず細胞内外の溶質濃度差によって生じる浸透圧ストレスによって誘導されると考えられてきた。しかし、本結果は、高糖濃度条件下におけるグリセロール生成機構が浸透圧ストレスに関連付けた従来の機構だけでなく、グルコース代謝の過程で生じる別の要因によっても制御されていることを示すものとなった。

## 文献

- 1) A. Muhammad and Z.A. Ahmad: Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **16**, 2671–2686 (2012).
- 2) C. Neuberg and E. Reinfurth: Natürliche und erzwungene Glycerin-bildung bei der alkoholischen Gärung. *Biochem. Z.*, **92**, 234–266 (1918).
- 3) C. Neuberg and E. Reinfurth: Weitere Untersuchungen über die korrelative Bildung von Acetaldehyd und Glycerin bei der Zuckerspaltung und neue Beiträge zur theorie der alkoholischen Gärung. *Ber. Deut. Chem. Ges.*, **52**, 1677–1703 (1919).
- 4) 農林水産省食品総合研究所日研化学, 久保直哉, 春見隆文, 若生勝雄, 小田恒郎: 新規微生物を用いた発酵によるポリオール類の製造方法. 特開昭 62-96089, 1987-05-02.
- 5) 若生勝雄, 川口 嶽, 久保直哉, 春見隆文, 林 清, 飯野和久: ポリオール高生産性新規酵母. 醗酵工学, **66**, 209–215 (1988).
- 6) J. Albertyn, S. Hohmann, J.M. Thevelein, and B.A. Prior: *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 4135–4144 (1994).
- 7) T. Hirayama, T. Maeda, H. Saito, and K. Shinozaki: Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (*HOR*) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **249**, 127–138 (1995).
- 8) J. Norbeck, A.K. Pålman, N. Akhtar, A. Blomberg, and L. Adler: Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the corresponding *GPP1* and *GPP2* genes and evidence for osmotic regulation of *Gpp2* p expression by the osmosensing mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.*, **271**, 13875–13881 (1996).
- 9) M. Rep, J. Albertyn, J.M. Thevelein, B.A. Prior, and S. Hohmann: Different signalling pathways contribute to the control of *GPD1* gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, **145**, 715–727 (1999).
- 10) R. Ansell, K. Granath, S. Hohmann, J.M. Thevelein, and L. Adler: The two isoenzymes for yeast NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J.*, **16**, 2179–2187 (1997).
- 11) A.K. Pålman, K. Granath, R. Ansell, S. Hohmann, and L. Adler: The yeast glycerol 3-phosphatases *Gpp1* p and *Gpp2* p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, **276**, 3555–3563 (2001).
- 12) F. Remize, L. Barnavon, and S. Dequin: Glycerol export and glycerol-3-phosphate dehydrogenase, but not glycerol phosphatase, are rate limiting for glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.*, **3**, 301–312 (2001).
- 13) M. Proft, G. Mas, E. de Nadal, A. Vendrell, N. Noriega, K. Struhl, and F. Posas: The stress-activated Hog 1 kinase is a selective transcriptional elongation factor for genes responding to osmotic stress. *Mol. Cell*, **23**, 241–250 (2006).
- 14) P.M. Alepuz, E. de Nadal, M. Zapater, G. Ammerer, and F. Posas: Osmostress-induced transcription by Hot 1 depends on a Hog 1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *EMBO J.*, **22**, 2433–2442 (2003).
- 15) M.T. Martinez-Pastor, G. Marchler, C. Schüller, A. Marchler-Bauer, H. Ruis, and F. Estruch: The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins *Msn 2 p* and *Msn 4 p* are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *EMBO J.*, **15**, 2227–2235 (1996).
- 16) M. Rep, V. Reiser, U. Gartner, L.M. Thevelein, S. Hohmann, G. Ammerer, and H. Ruis: Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires *Msn 1 p* and the novel nuclear factor *Hot 1 p*. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 5474–5485 (1999).
- 17) P.M. Alepuz, A. Jovanovic, V. Reiser, and G. Ammerer: Stress-induced MAP kinase Hog 1 is part of transcription activation complexes. *Mol. Cell*, **7**, 767–777 (2001).
- 18) D. Mizushima, H. Iwata, Y. Ishimaki, J. Ogihara, J. Kato, and T. Kasumi: Two glycerol 3-phosphate dehydrogenase isogenes from *Candida versatilis* SN-18 play an important role in glycerol biosynthesis under osmotic stress. *J. Biosci. Bioeng.*, **121**, 523–529 (2016).
- 19) K. Larsson, R. Ansell, P. Eriksson, and L. Adler: A gene encoding *sn*-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, **10**, 1101–1111 (1993).
- 20) P. Eriksson, L. André, R. Ansell, A. Blomberg, and L. Adler: Cloning and characterization of *GPD 2*, a second gene encoding *sn*-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in *Saccharomyces cerevisiae*, and its comparison with *GPD1*. *Mol. Microbiol.*, **17**, 95–107 (1995).
- 21) J. Zhuge, H.Y. Fang, Z.X. Wang, D.Z. Chen, H.R. Jin, and H. L. Gu: Glycerol production by a novel osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**, 682–692 (2001).
- 22) X. Chen, H. Fang, Z. Rao, W. Shen, B. Zhuge, Z. Wang, and J. Zhuge: Cloning and characterization of a NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene from *Candida glycerinogenes*, an industrial glycerol producer. *FEMS Yeast Res.*, **8**, 725–734 (2008).
- 23) D.K. Sahoo and G.P. Agarwal: Effect of oxygen transfer on glycerol biosynthesis by an osmophilic yeast *Candida magnoliae* (2)B. *Biotechnol. Bioeng.*, **78**, 545–555 (2002).
- 24) D.H. Lee, M.D. Kim, Y.W. Ryu, and J.H. Seo: Cloning and characterization of *CmGPD1*, the *Candida magnoliae* homologue of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *FEMS Yeast Res.*, **8**, 1324–1333 (2008).
- 25) G. Denis, C. Pierre, and T.L.S.T.H. Yuen: Production of polyols and ethanol by osmophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Biotechnol. Lett.*, **17**, 315–320 (1995).
- 26) T. Iwaki, S. Kurono, Y. Yokose, K. Kubota, Y. Tamai, and Y. Watanabe: Cloning of glycerol-3-phosphate dehydrogenase genes (*ZrGPD1* and *ZrGPD2*) and glycerol dehydrogenase genes (*ZrGCY1* and *ZrGCY2*) from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Yeast*, **8**, 737–744 (2001).
- 27) B. Enjalbert, A. Nantel, and M. Whiteway: Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response. *Mol. Biol. Cell*, **14**, 1460–1467 (2003).
- 28) Y. Watanabe, K. Nagayama, and Y. Tamai: Expression of glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene (*CvGPD1*) in salt-tolerant yeast *Candida versatilis* is stimulated by high concentrations of NaCl. *Yeast*, **25**, 107–116 (2008).
- 29) P.E. Thomé and R.K. Trench: Osmoregulation and the genetic induction of glycerol-3-phosphate dehydrogenase by NaCl in the euryhaline yeast *Debaryomyces hansenii*. *Mar. Biotechnol.*, **1**, 230–238 (1999).
- 30) R.H. De Deken: The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J. Gen. Microbiol.*, **2**, 149–156 (1966).