

真菌中一氧化氮生物合成、降解及功能的研究进展

陈一多^{1,2}, 张震², 姜华², 王艳丽², 孙国昌^{2*}

¹浙江师范大学化学与生命科学学院, 金华 321004

²浙江省植物有害生物防控重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 杭州 310021

摘要:一氧化氮是一个有较高活性的自由基气体分子,无论在动植物还是微生物中,作为一个细胞内和细胞间的信号传导分子,它在许多的生理和病理过程中都发挥着双向的调节作用。研究发现真菌细胞可以合成一氧化氮,适当浓度的一氧化氮在真菌细胞内发挥多种重要的生物学功能,一旦一氧化氮过量累积,这个自由基分子会对细胞造成伤害,导致细胞凋亡。一氧化氮介导生成的环鸟苷酸(cGMP)作为一种重要的第二信使分子涉及到真菌细胞内多种信号途径的调控,调节了整个真菌类群的生长发育、形态发生、孢子形成和萌发、繁殖和细胞凋亡的过程,影响了真菌整个生命周期的生理活动。到目前为止,尽管一氧化氮在动植物中作用的机制得到了广泛的研究,但一氧化氮在真菌中的研究报道很有限。关于一氧化氮在真菌中的合成和降解途径,一氧化氮介导的信号传导机制的研究还不透彻,它在真菌细胞内的功能和毒理还有待于更深入的研究。

关键词:一氧化氮, 环鸟苷酸, 一氧化氮合成酶, 黄素血红蛋白, 一氧化氮反应元件

中图分类号:Q935 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2013)01-0006-09

一氧化氮(Nitric oxide, NO)是一种无色无味,具有脂溶性的非极性自由基气体小分子,也是一种重要的参与一系列关键的信号传导途径、调控多种生理过程的信号分子。它能快速扩散通过细胞膜,这是NO能成为信使分子的重要原因之一,从而将一个细胞产生的信号传递到周围的细胞中。根据当前的报道,NO涉及到神经、免疫、心血管系统的信号转导途径,病原菌的致病性侵染过程,细胞的氧化呼吸链能量消耗,细胞防卫免疫应答机制和细胞程序性死亡等多个生理过程的调控^[1-2]。

研究表明真菌细胞可以主动地通过生物合成产

生NO,这种有目的的NO合成表明NO在真菌内发挥着重要的生物学功能。NO可以激活环鸟苷酸(Cyclic guanosine monophosphate, cGMP)的合成,cGMP作为一种重要的第二信使分子参与了多种信号通路的调控^[3],从而影响真菌的生长及形态建成。NO也直接参与某些基因的转录^[4-6];还参与调节细胞的氧化压力、蛋白质的S-亚硝基化修饰和酪氨酸硝化^[7]。这些机制的动态平衡对于维持真菌细胞正常的生理活动起着非常关键的作用。总体上,真菌中NO的相关研究相对较少,但现有研究表明NO涉及低等真菌类群(如壶菌门,接合菌门)到

基金项目:浙江省公益技术研究农业项目(2011C22008);浙江省优先主题资助项目(2011C12022)

* 通信作者。Tel: +86-571-86404073; E-mail: sungc01@sina.com

作者简介:陈一多(1988-),男,江苏常州人,硕士研究生,研究方向为植物病原真菌分子生物学。E-mail: cheniduo5566@163.com

收稿日期:2012-08-10; **修回日期:**2012-10-15

高等真菌类群(如子囊菌门,担子菌门)的生长发育、形态建成、孢子形成和萌发、繁殖和凋亡的控制^[3, 8-9]。

1 NO 在真菌中的合成及代谢

1.1 NO 的存在状态

NO 在真菌中的活性状态主要有亚硝酸盐(NO_2^-)、硝酸盐(NO_3^-)、过氧亚硝基阴离子(ONOO^-)和一氧化二氮(N_2O)等。其中 NO_2^- 、 NO_3^- 、 ONOO^- 可以通过自然氧化过程生成, NO_2^- 也可以在细胞色素 c 氧化酶(Cytochrome-c oxidase, CcO)和氧合血红蛋白的催化下生成,而 N_2O 可通过 NO 还原酶生成^[10-11]。此外,还原型谷胱甘肽(Reduced glutathione, GSH)可以和 NO 反应生成 S-亚硝基化谷胱甘肽(S-nitrosylated glutathione, GSNO),由于此反应是可逆的,GSNO 被认为是 NO 的存储库,真菌细胞内的 NO 由此以 S-亚硝基化的形式储存,对于维持细胞内 NO 含量水平的动态平衡起着重要作用。

1.2 真菌中 NO 的合成:氧化型和还原型合成

NO 可以从许多氮氧化物如酸性环境中的亚硝酸盐(NO_2^-)中释放出来,除了这种化学合成外,NO 也可以通过酶促反应生成(图 1)。

用同位素标记的方法在壶菌 *Blastocladiella emersonii*, 子囊菌 *Neurospora crassa* 中观察到存在 L- ^3H 精氨酸到 L- ^3H 瓜氨酸的转变,并伴随着副产物 NO 的释放,且哺乳动物 NOS 酶的抑制剂如 N ω -nitro-L-arginine methyl ester(L -NAME)处理真菌细胞也具有类似的抑制效果,暗示真菌中存在类似于哺乳动物 NOS 酶的 NO 合成酶^[3]。对 *B. emersonii* 的荧光标记显示 NO 合成酶的活性出现在细胞粗提液中^[3],且 NO 清除分子黄素血红蛋白(flavo-hemoglobin, flavoHb)大量存在于细胞质内^[12],表明细胞质是真菌主要的氧化型 NO 合成位点(图 1)。有氧条件下,细胞质中 NO 的氧化型合成具有主导地位^[3]。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞中 NO 的来源还存在争议,因为在 *S. cerevisiae* 的基因组中没有发现哺乳动物的 NOS 酶的同源基因,但药理学分析显示 *S. cerevisiae* 细胞中确实存在一种蛋白起着与哺乳动物 NOS 酶类似的功能,且这种蛋白在其他酵母属真菌中普遍存在^[13]。

除了细胞质中 NO 氧化型合成外,在缺氧条件下真菌中还存在还原型 NO 的合成途径(图 1)。还原型 NO 的合成包括缺氧条件下由细胞色素 c 氧化酶(CcO)在线粒体中催化 NO_2^- 生成 NO,和亚硝酸还原酶(Nitrite reductase, NR)在细胞质中催化 NO_2^-

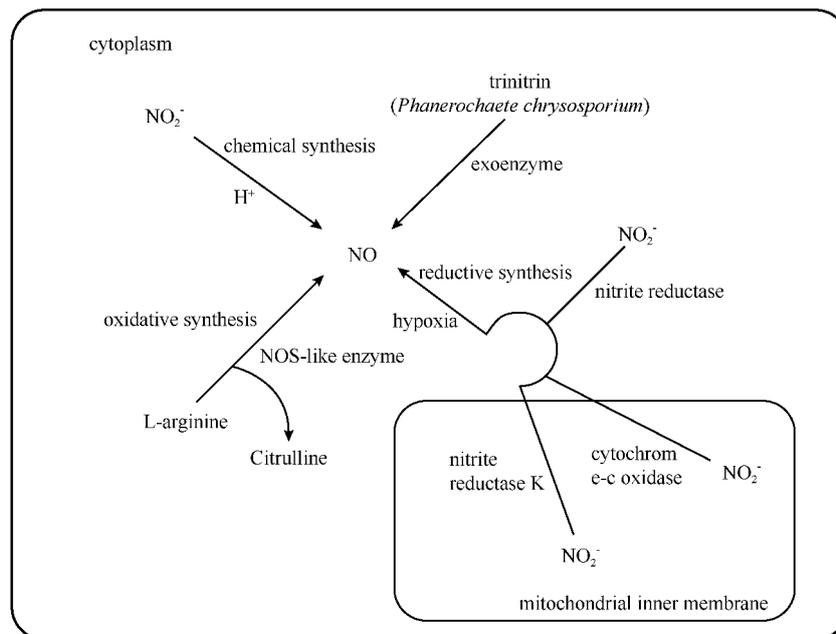


图 1 NO 在真菌中的合成途径

Fig. 1 Biosynthesis of NO in the Fungal cell.

生成 NO。虽然在真菌线粒体中没有观察到 NOS 类酶的活性,但却存在 NO 清除分子 flavoHb,这暗示线粒体可能是还原型 NO 合成的主要位点^[12]。此外,线粒体内膜上的一个含 Cu 的异化亚硝酸还原酶(Nitrite reductase K, NirK),可以在依赖 NADP 的情况下催化 NO_2^- 生成 NO^[14]。在 *S. cerevisiae* 中,这些还原型 NO 合成途径可诱导缺氧应答基因 *CYC7* 和 *COX5b* 的转录,从而保证了 ATP 的合成以及细胞对于缺氧条件的适应性,对 *S. cerevisiae* 细胞适应低氧环境起着重要作用。

在部分真菌中,NO 合成还存在一条特殊的途径,如 *Phanerochaetechrysosporium* 可以通过降解三硝酸甘油而释放 NO(图 1)^[15]。

1.3 真菌中 NO 的降解途径

NO 在生物体内含有多种降解途径(图 2)。NO 可以通过自然氧化过程被分解成亚硝酸盐(NO_2^-)、硝酸盐(NO_3^-)和过氧亚硝基阴离子(ONOO^-);NO 通过 NO 还原酶可以生成 N_2O ;NO 还可以和 flavoHb 相互作用,通过氧化 NO 生成 NO_3^- 来清除过剩的 NO,这也是细胞清除多余 NO 的重要机制^[10-11]。此外,蛋白质的 S-亚硝基化,酪氨酸硝化也可以降低胞内 NO 含量水平^[16],例如 NO 可以和还原型谷胱甘肽(GSH)反应生成 S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)并进一步在 GSNO 还原酶(S-nitrosylated glutathionereductase, GSNOR)催化下生成氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)。

2 NO 在真菌中参与的调控机制

2.1 NO 介导的信号传导

真菌细胞内存在多个 NO 的作用位点,包括黄素血红蛋白,细胞色素类,过氧化氢酶,铁硫酶如顺乌头酸酶和 NADH 脱氢酶等^[17-18]。其中含亚铁血红素的裂解酶,即 2 型鸟苷酸环化酶(Guanylatecyclase, cGMPase)是主要的靶位点^[19]。cGMPase 可以催化三磷酸鸟苷(GTP)转化成环鸟苷酸(cGMP),它是一个重要的胞内第二信使分子,参与多种信号途径的传导。目前为止很少有报道详细阐述这些靶位点的作用机理。

顺乌头酸酶是另一个重要的 NO 作用位点。研究发现顺乌头酸酶,在三羧酸循环中可以催化异柠檬酸转化成柠檬酸,它利用一个对 NO 敏感的 Fe-S

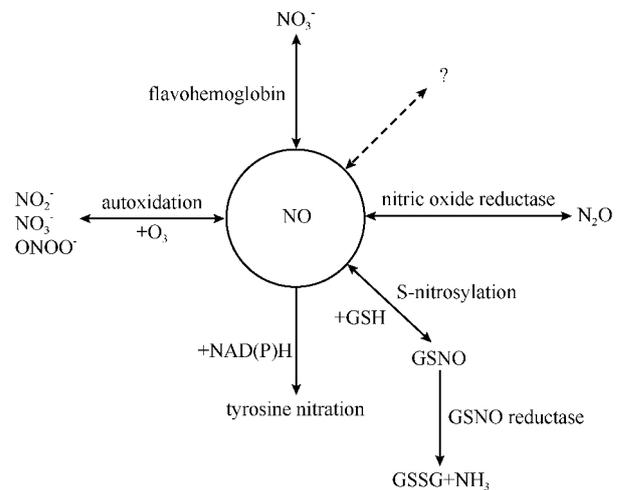


图 2 NO 在真菌中的降解途径(图中虚线表示未知的降解途径)

Fig. 2 Degradation of NO in the Fungi cell.

簇,可与黄素血红蛋白(flavoHb)相互作用^[20]。在 *Escherichia coli* 中,flavoHb 基因的敲除会使顺乌头酸酶对 NO 异常敏感,导致 TCA 循环受到抑制^[21]。高通量蛋白质组学研究发现 *S. cerevisiae* 细胞中 flavoHb 会特异地结合顺乌头酸酶以及一个 Fe 伴侣蛋白^[22],目前还不能解释这种互作的功能。

2.2 NO 在真菌中直接参与调控基因表达

细菌和真菌中,黄素血红蛋白基因(flavoHb)的序列是相当保守的。*E. coli* 的 *HmpA* 和 *S. cerevisiae* 的 *Yhb1p* 在催化靶位点上具有 34% 的相似性,尽管在序列和功能上具有相似的地方,但细菌和真菌调控 flavoHb 表达的机制是截然不同的。细菌通常利用 NO 敏感型的转录抑制因子(例如 *NsrR*),而真菌是通过转录激活元件来诱导 flavoHb 表达^[23]。

在 *S. cerevisiae* 中发现一个 Cys_2His_2 的锌指结构的转录因子 *Fzf1p*,它是一个 NO 敏感型的正向调节因子,控制着编码 flavoHb (*yhb1*) 和亚硫酸盐转运蛋白 *Ssu1p* 的基因^[24],负责操纵依赖于 NO 的 flavoHb 的诱导。而且, *Fzf1p* 对于 *S. cerevisiae* 是特异的,在其他真菌基因组内不存在。而 *Fzf1p* 感受识别 NO 的机理目前还不清楚^[25]。此外,NO 在 *S. cerevisiae* 中调控转录之前,发现可能涉及到转录因子 *Yap1* 在细胞核迁移,启动抗氧化剂基因转录的过程^[6]。

Chiranand 等人对 *S. cerevisiae* 中 flavoHb 启动子随机突变体的研究发现一个 33 bp 的 NO 敏感区,称为 NO 反应元件(NO Responsive Element, NORE),

它对于 *S. cerevisiae* 的 *flavoHb* 基因 *CaYhb1* 的转录是必需的^[4]。利用这个 33 bp 的 DNA 片段分离和鉴定了五种特异的 NORE 结合蛋白, 包括含有锌指结构的转录因子。其中转录因子 *Cta4p* 敲除突变体表现出对 NO 敏感性的丧失, 而其他四种突变体基本不受影响。*Cta4p* 属于 $Zn(II)_2-Cys_6$ 转录因子家族^[4], 可以结合到 *flavoHb* 的启动子上。这些数据表明, 感受元件或共激活蛋白感受 NO 后产生的激活信号传递给了 *Cta4p*^[23]。作为基因表达多样性的备选, 一个激活蛋白类的含亮氨酸拉链结构的转录因子 (*SpFzfl*) 也可以起类似的作用^[5]。

目前为止, NO 在真菌中间接参与基因表达的报道还有限, 有待于进一步研究。但是, 如果 NO 引起转录因子的 S-亚硝基化或酪氨酸硝化, 从而可能会间接影响真菌相关基因的表达水平。

3 NO 在真菌中的功能

3.1 NO 参与真菌光周期并调控孢子形成和萌发

光是决定真菌的生活周期的一个重要因素, 光信号可以激活细胞的形态建成^[26]。在 *Phycomycesblakesleeanus* 中, 光照会诱导细胞释放 NO, 表明 NO 可能参与了光信号介导的真菌光生活周期^[27]。同样地, 在子囊菌中, 荧光染色发现产孢

原始细胞和早期的分生孢子期细胞是 NO 生成的主要位点, 可见, NO 也控制子囊菌的无性孢子形成以及光依赖的孢子分化过程^[28]。

目前已经证实 NO 参与了担子菌门的光形态建成(图 3)。研究表明, 担子菌有性孢子在子实体中形成, 而子实体的正常生长需要光照, 在担子菌中观察到依赖 NADPH, FAD, BH_4 和 FMN 为标志的类似 NOS 酶参与的精氨酸/瓜氨酸的转变, 且持续光照可增加其活性, 由此产生的 NO 刺激了真菌生长和子实体的形成, 这证明 NO 在光依赖的子实体的生殖生长中发挥了作用^[8]。

NO 在真菌生理学上的一个重要功能是控制孢子形成和萌发, 这已在相当数量的真菌中得到了证实。真菌孢子的形成和萌发是通过一系列的信号传导协同完成的, 包括 cGMP, MAPK 和光信号通路等^[29]。在 *B. emersonii* 中发现 NO 介导 cGMP 信号通路, 一旦 cGMP 合成受抑制, 就不能形成孢子^[3, 30]。这些都证明了孢子形成和萌发受 NO 的调控。

3.2 单胞真菌孢子形成过程中的 NO/cGMP 通路

一般认为 NO 可能通过介导 NO/cGMP 信号通路调控着 *Schizosaccharomycespombe* 的孢子形成过程(图 3)。多数真菌中只要少量的鸟苷酸环化酶(cGMPase)活性就会影响孢子形成, 但酵母属菌(包括 *S. cerevisiae*、*Schizosaccharomycespombe*、*Candida*

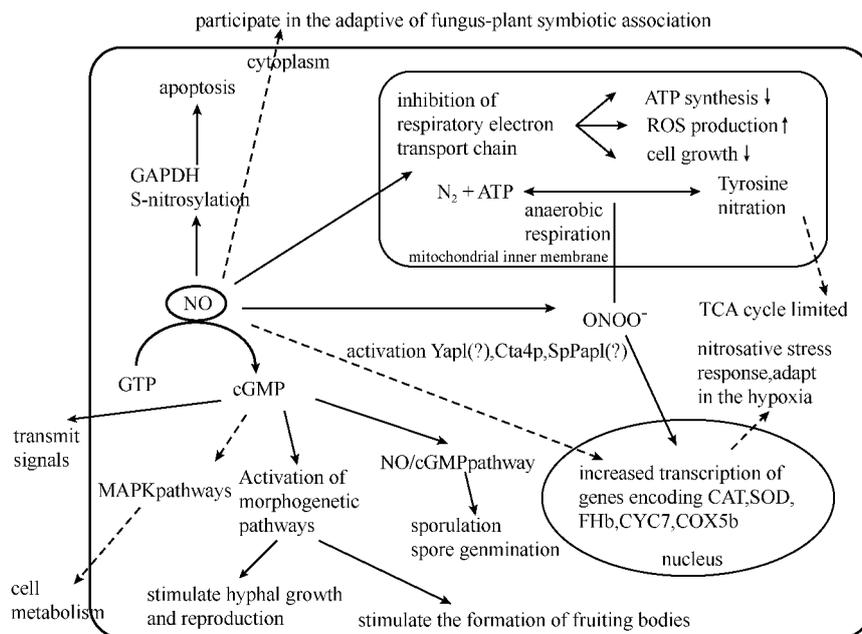


图 3 NO 在真菌细胞中的功能和毒理(图中虚线表示具体的调控机理还有待研究)

Fig. 3 The function of NO in the Fungi cell.

albicans) 的基因组缺少 cGMPase 的同源基因^[31], 这使得酵母属菌中 NO/cGMP 信号传导通路是否发挥作用很难解释。*C. albicans* 中 cGMPase 抑制剂和催化剂的研究也得出了有争议的结论: cGMPase 催化剂(如 LY-83583, 米诺地尔)和 cGMP 磷酸二酯酶抑制剂(如 MY-5445, MBCQ)不会影响 *C. albicans* 的光形态发生和生存^[13], 这些结果暗示这些配体的研究不能全面反映酵母属菌中的 NO/cGMP 通路的作用机制。

3.3 NO 参与真菌代谢过程中的抗氧化过程

在担子菌门中, NO 可以帮助细胞对抗氧化压力。在担子菌门代表性物种 *Agaricus bisporus* 中, 外源 N 源复合物 2, 2'-(hydroxynitrosohydrazino) bis-ethanamine 可以释放 NO 降低氧化性伤害。研究显示 NO 在担子菌中可以降低过氧化物的生成率和过氧化氢的含量, 抑制多酚氧化酶 (Polyphenol oxidase, PPO) 的活性, 提高过氧化氢酶 (Catalase, CAT), 过氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 和抗坏血酸过氧化物酶 (Ascorbate peroxidase, APX) 等抗氧化酶类的活性, 有效减轻氧化性损害。在腐生担子菌 *P. chrysosporium* 中, NO 可以调控胞液和微粒体中谷胱甘肽转移酶系统, 从而抑制羟基氧自由基的生成, 减少其对细胞的毒害作用^[15]。

4 NO 对真菌细胞的毒副作用及其清除机制

一方面 NO 在真菌生化系统中起着重要的生物学功能, 另一方面, NO 在细胞内过量累积会引起细胞死亡^[32], 这个有害的自由基气体分子会对细胞内的蛋白质, 脂类和 DNA 造成损伤, 导致细胞凋亡^[2]。研究认为, NO 主要通过直接毒性引起真菌细胞的死亡, 但它的机理目前还不是很清楚, 可能与以下几方面相关: 第一, NO 本身具有细胞毒性, 会与氧反应生成 OONO^- , 这两种自由基均可直接杀死真菌。第二, NO 对细胞的 DNA 造成损伤, 损害了真菌遗传信息的传递过程。第三, NO 通过抑制呼吸电子传递链上的酶如 CcO, 影响了细胞的能量代谢。

4.1 NO 在真菌内过剩会引起亚硝化应激和细胞凋亡

4.1.1 通过亚硝化应激延缓了孢子萌发: 子囊菌的孢子萌发实验证明 NO 在真菌细胞内可能会引起亚

硝化应激和氧化应激。子囊菌 *Colletotrichum coccodes* 孢子萌发阶段施用过量的外源 NO 会延缓萌发, 缩减了 cGMP 在细胞内的浓度水平^[33]。由此推测过量的 NO 降低了分生孢子的 cGMP 含量, 并推迟了萌发。这也暗示 NO/cGMP 通路对于萌发的延迟可能起作用。

4.1.2 氧化应激和亚硝化应激参与了细胞凋亡的过程: 在真菌中由 NO 引起的蛋白质 S-亚硝基化可能会导致细胞凋亡的启动。在 *S. cerevisiae* 中, 一个典型的糖分解的酶, 即 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 是一个重要的细胞凋亡的介质^[34], 研究表明 GAPDH 的 S-亚硝基化会促进 *S. cerevisiae* 细胞的凋亡并与胞内活性氧族 (Reactive oxygen species, ROS) 合成量上升密切相关^[9]。Almeida 等认为, 正是 NO 的合成促进了 GAPDH 的 S-亚硝基化以及它到线粒体中的转运, 从而介导了细胞凋亡的启动^[9]。用外来 N 源 DETA/NO 处理酵母细胞, 进一步证明了暴露在 NO 压力下的 GAPDH 发生了 S-亚硝基化^[9], 表明 NO 和 GAPDH 在 *S. cerevisiae* 凋亡的信号传导过程中起着重要作用。

4.2 真菌应对亚硝化应激的机制

4.2.1 黄素血红蛋白 (flavoHb) 和 S-亚硝基谷胱甘肽还原酶 (GSNOR): 在模式菌 *S. cerevisiae* 中, 黄素血红蛋白 (flavoHb, *yhb1* 基因编码) 和 GSNO 还原酶 (GSNOR, 由 *sfal* 基因编码) 可以高效介导 NO 和 GSNO 的代谢, 它介导了胞内主要的 NO 清除机制^[35]。

flavoHb 是 NO 氧化还原酶, 它把 NO 转化成 NO_3^- , 在单独结合 NADPH, FAD 和 O_2 的情况下, 它可以组成多种重要的参与 NO 去除的酶^[36]。研究表明在真菌孢子萌发中, 编码 flavoHb 的基因转录水平明显升高, 而 flavoHb 基因的缺失使酵母细胞对 NO 更敏感, 同时蛋白质的 S-亚硝基化水平也会升高, 说明细胞通过提高 flavoHb 的表达水平来应对 NO 压力, 从而保护萌发中的分生孢子作出亚硝化压力应答^[36]。flavoHb 也在其他的真菌如 *Aspergillus*、*C. albicans*、*S. cerevisiae* 中起同样的作用^[7, 12]。在 *Saccharomyces*、*Magnaporthe oryzae* 和 *Neurospora crassa* 中都发现了黄素血红蛋白的同源基因^[7, 12, 35]。表明黄素血红蛋白在真菌中对于限制内生的 NO 合成过量, 保护细胞应对亚硝化压力起着非常关键的作用。

S-nitrosylated glutathionereductase (GSNOR) 是 GSNO 还原酶, 它催化 GSNO (GSNO 在 NO 压力下生成) 转化成 GSSG。在 *Cryptococcus neoformans* 中, GSNOR 基因的缺失使其感染毒性有一定的减弱^[37]。在 *S. cerevisiae* 中, GSNOR 基因的缺失会导致细胞对于 GSNO 介导的亚硝化压力的敏感性增强。GSNOR 的缺失同时伴随着蛋白质 S-亚硝化水平的上升。在病原真菌与寄主的互作机制中, 伴随着寄主 iNOS 转录水平的升高, 这种影响会被级联放大, 引起组织损伤和死亡^[38]。

4.2.2 抗氧化剂: 真菌也已经发展出了一系列其他的去硝化机制来对抗 NO 过剩^[7], 亚硝化应激可以提高一些编码抗氧化酶类如过氧化氢酶 (CAT), 过氧化物歧化酶 (SOD)^[6] 基因的转录水平, 在 *S. cerevisiae* 中, 谷胱甘肽过氧化物酶 3 (Gpx3) 与 GAPDH 相互作用, 参与胞内的氧化压力保护, 从而影响细胞的生存和凋亡。一些真菌致病菌相比较与 *S. cerevisiae* 可以激活一系列的氧化和亚硝化压力应答基因包括过氧化氢酶, 超氧化物歧化酶, 硫氧还蛋白和谷氧还蛋白等的转录^[39]。

5 真菌中 NO 的研究前景及未知点

在哺乳动物和植物细胞中, NO 和 ROS 乃至 RNS 已受到了研究者越来越多的注意, 因为它们在新陈代谢中所表现出的生理学效应, 而且一旦它们在细胞内不受控制的过量合成, 也会造成大范围的破坏效应^[40]。然而, 在微生物特别是真菌中, 关于 NO 及其相关分子尚缺少足够的研究。

尽管在真菌中 NOS 类似酶被认为是真菌 NO 合成的主要来源, 但还不能排除其他的一些酶促的 NO 合成途径。微生物中 NO 的清除一直都不是研究的很透彻, 直到大约 15 年前 flavoHb 被鉴定之后, 它一直被认为是细菌和真菌中占主导地位的 NO 清除酶。目前为止, NO 的代谢及此过程中胞内的作用位点还有待深入研究。

真菌细胞可以通过多种机制感受并传递 NO 信号, 引起相应的生理学反应。其中涉及到多种转录因子包括 *Cta4p*、*Yap1* 和 *SpPap1*, 但我们目前对于这些大分子量的蛋白还知之甚少, 将来对于这些转录因子结合蛋白以及它们潜在的翻译后修饰 (例如 S-亚硝基化、磷酸化) 的研究将会揭示它们是如何感

受 NO 信号并介导相关基因表达。

尽管 NO 在哺乳动物和植物中的作用和机制得到了广泛的研究, 并取得了巨大的进展, 但是在微生物中的研究却相对落后。NO 作为一种信号分子, 能够调控真核生物生命活动的很多过程, 这使科学家提出一种假设: 真菌中 NO 可能存在与动植物中类似的生物学作用, 研究已经表明 NO 可能在真菌的信号转导及代谢途径中具有重要作用。但是关于真菌中 NO 作用和机理的研究还很有限, 这必将引起科研工作者更多的重视和研究。近来我们研究发现, 在 *M. oryzae* 中 NO 可能参与了分生孢子的形成, 附着胞萌发及其自身形态发育过程, 但具体作用机理还有待深入研究。

目前研究 NO 在真菌中功能的常用手段是补加外源的 NO, 由此产生的活性氮 (Reactive nitrogen species, RNS) 会与真菌细胞自然产生的 ROS 发生交联互作的化学反应, 因此以 RNS 为研究对象的实验中可能会包含这种互作的影响, 这个问题需要进一步得到解决。研究真菌 ROS 和 RNS 的作用时, 氧化性压力和亚硝化压力是同时存在的, 无法区分开, 因此有必要了解真菌中这两种压力胁迫相互结合之后会有何影响。此外, 关于真菌中 ROS 和 RNS 的信号传导通路的研究还需要深入进行。对于真菌 RNS 应答调控的机制还是一片空白。这些都是未来研究 NO 在真菌中作用时所面临的挑战。

参考文献

- [1] Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2002, 53: 503-514.
- [2] Calabrese V, Cornelius C, Rizzarelli E, Owen JB, Dinkova-Kostova AT, Butterfield DA. Nitric oxide in cell survival: a janus molecule. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2009, 11: 2717-2739.
- [3] Vieira AL, Linares E, Augusto O, Gomes SL. Evidence of a Ca⁽²⁺⁾-(*) NO-cGMP signaling pathway controlling zoospore biogenesis in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Fungal Genetics and Biology*, 2009, 46: 575-584.
- [4] Chiranand W, McLeod I, Zhou H, Lynn JJ, Vega LA, Myers H, Yates JR, 3rd, Lorenz MC, Gustin MC. CTA4 transcription factor mediates induction of

- nitrosative stress response in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 2008, 7: 268-278.
- [5] Kim HJ, Jung HY, Lim CJ. The pap1 (+) gene of fission yeast is transcriptionally regulated by nitrosative and nutritional stress. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 280: 176-181.
- [6] Lushchak OV, Inoue Y, Lushchak VI. Regulatory protein Yap1 is involved in response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* to nitrosative stress. *Biochemistry (Moscow)*, 2010, 75: 629-664.
- [7] Tillmann A, Gow NA, Brown AJ. Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in yeast. *Biochemical Society Transactions*, 2011, 39: 219-223.
- [8] Song NK, Jeong CS, Choi HS. Identification of nitric oxide synthase in *Flammulina velutipes*. *Mycologia*, 2000, 1027-1032.
- [9] Almeida B, Buttner S, Ohlmeier S, Silva A, Mesquita A, Sampaio-Marques B, Osorio NS, Kollau A, Mayer B, Leao C, Laranjinha J, Rodrigues F, Madeo F, Ludovico P. NO-mediated apoptosis in yeast. *Journal of Cell Science*, 2007, 120: 3279-3288.
- [10] Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Gladwin MT. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology*, 2006, 26: 697-705.
- [11] Tsoukias NM. Nitric oxide bioavailability in the microcirculation: insights from mathematical models. *Microcirculation*, 2008, 15: 813-834.
- [12] Cassanova N, O'Brien KM, Stahl BT, McClure T, Poyton RO. Yeast flavohemoglobin, a nitric oxide oxidoreductase, is located in both the cytosol and the mitochondrial matrix: effects of respiration, anoxia, and the mitochondrial genome on its intracellular level and distribution. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 7645-7653.
- [13] Toenjes KA, Stark BC, Brooks KM, Johnson DI. Inhibitors of cellular signalling are cytotoxic or block the budded-to-hyphal transition in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology*, 2009, 58: 779-790.
- [14] Nakanishi Y, Zhou S, Kim SW, Fushinobu S, Maruyama J, Kitamoto K, Wakagi T, Shoun H. A eukaryotic copper-containing nitrite reductase derived from a NirK homolog gene of *Aspergillus oryzae*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2010, 74: 984-991.
- [15] Servent D, Ducrocq C, Henry Y, Guissani A, Lenfant M. Nitroglycerin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*: evidence for nitric oxide and nitrite formation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, 1074: 320-325.
- [16] Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS. S-nitrosylation in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 2003, 9: 160-168.
- [17] Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobo N, Schopfer F, Boveris A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1996, 328: 85-92.
- [18] Cooper CE. Nitric oxide and iron proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1411: 290-309.
- [19] Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3': 5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1977, 74: 3203-3207.
- [20] Hibbs JB, Jr., Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1988, 157: 87-94.
- [21] Gardner AM, Gardner PR. Flavohemoglobin detoxifies nitric oxide in aerobic, but not anaerobic, *Escherichia coli*. Evidence for a novel inducible anaerobic nitric oxide-scavenging activity. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 8166-8171.
- [22] Gavin AC, Aloy P, Grandi P, Krause R, Boesche M, Marzioch M, Rau C, Jensen LJ, Bastuck S, Dumpelfeld B, Edelmann A, Heurtier MA, Hoffman V, Hoefert C, Klein K, Hudak M, Michon AM, Schelder M, Schirle M, Remor M, Rudi T, Hooper S, Bauer A, Bouwmeester T, Casari G, Drewes G, Neubauer G, Rick JM, Kuster B, Bork P, Russell R, B, Superti-Furga G. Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature*, 2006, 440: 631-636.
- [23] Forrester MT, Foster MW. Protection from nitrosative stress: A central role for microbial flavohemoglobin. *Free Radical Biology & Medicine*, 2012, 52 (9) : 1620 - 1633.
- [24] Sarver A, DeRisi J. Fzf1p regulates an inducible response to nitrosative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16: 4781-4791.

- [25] Avram D, Leid M, Bakalinsky AT. Fz1p of *Saccharomyces cerevisiae* is a positive regulator of SSU1 transcription and its first zinc finger region is required for DNA binding. *Yeast*, 1999, 15: 473-480.
- [26] Rodriguez-Ramos T, Carpio Y, Bolivar J, Espinosa G, Hernandez-Lopez J, Gollas-Galvan T, Ramos L, Pendon C, Estrada MP. An inducible nitric oxide synthase (NOS) is expressed in hemocytes of the spiny lobster *Panulirus argus*: cloning, characterization and expression analysis. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29: 469-479.
- [27] Maier J, Hecker R, Rockel P, Ninnemann H. Role of nitric oxide synthase in the light-induced development of sporangiophores in *Phycomyces blakesleeana*. *Plant Physiology*, 2001, 126: 1323-1330.
- [28] Gong X, Fu Y, Jiang D, Li G, Yi X, Peng Y. L-arginine is essential for conidiation in the filamentous fungus *Coniothyrium minitans*. *Fungal Genetics and Biology*, 2007, 44: 1368-1379.
- [29] Barhoom S, Sharon A. cAMP regulation of "pathogenic" and "saprophytic" fungal spore germination. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41: 317-326.
- [30] Gottschalk WK, Sonneborn DR. Phenotypic dissections of the *Blastocladiella emersonii* zoospore's developmental choice. *Developmental Biology*, 1982, 93: 165-180.
- [31] Schaap P. Guanylyl cyclases across the tree of life. *Frontiers in Bioscience*, 2005, 10: 1485-1498.
- [32] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. *Biochemical Society Transaction*, 1989, 17: 642-644.
- [33] Wang J, Higgins VJ. Nitric oxide has a regulatory effect in the germination of conidia of *Colletotrichum coccodes*. *Fungal Genetics and Biology*, 2005, 42: 284-292.
- [34] Magherini F, Tani C, Gamberi T, Caselli A, Bianchi L, Bini L, Modesti A. Protein expression profiles in *Saccharomyces cerevisiae* during apoptosis induced by H_2O_2 . *Proteomics*, 2007, 7: 1434-1445.
- [35] Liu L, Zeng M, Hausladen A, Heitman J, Stamler JS. Protection from nitrosative stress by yeast flavohemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2000, 97: 4672-4676.
- [36] Turrion-Gomez JL, Eslava AP, Benito EP. The flavohemoglobin BCFHG1 is the main NO detoxification system and confers protection against nitrosative conditions but is not a virulence factor in the fungal necrotroph *Botrytis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology*, 2010, 47: 484-496.
- [37] Stroehrer UH, Kidd SP, Stafford SL, Jennings MP, Paton JC, McEwan AG. A pneumococcal MerR-like regulator and S-nitrosoglutathione reductase are required for systemic virulence. *The Journal of Infectious Diseases*, 2007, 196: 1820-1826.
- [38] Liu L, Yan Y, Zeng M, Zhang J, Hanes MA, Ahearn G, McMahon TJ, Dickfeld T, Marshall HE, Que LG, Stamler JS. Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell*, 2004, 116: 617-628.
- [39] Yin Z, Stead D, Walker J, Selway L, Smith DA, Brown AJ, Quinn J. A proteomic analysis of the salt, cadmium and peroxide stress responses in *Candida albicans* and the role of the Hog1 stress-activated MAPK in regulating the stress-induced proteome. *Proteomics*, 2009, 9: 4686-4703.
- [40] Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2004, 101: 4003-4008.

Research progress in nitric oxide biosynthesis, degradation and function in fungi

Yiduo Chen^{1,2}, Zhen Zhang², Hua Jiang², Yanli Wang², Guochang Sun^{2*}

¹College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

²Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China

Abstract: Nitric oxide is a highly reactive molecule with dichotomous regulatory roles in numerous physiological and pathological events. It has been recognized as an intra- and inter-cellular signaling molecule in animals, plants and microorganisms. Recent research data indicate that fungi are capable of synthesizing nitric oxide. Appropriate amounts of nitric oxide play important biological roles in fungal cells. However, excessive amounts of nitric oxide will damage cells and evoke apoptosis. Nitric oxide regulates the synthesis of cGMP, an important intracellular secondary messenger molecule, involved in the control of a variety of signal transduction pathways in fungal cells. Nitric oxide regulates the cellular development, morphogenesis, sporulation, spore germination, reproduction and apoptosis in fungi. Nitric oxide affects the physiological function of fungi throughout the life cycle. Although the mechanism of nitric oxide in plants and animals has been widely studied, there are limited reports about nitric oxide in fungi; and further investigation is needed to illustrate the nitric oxide synthesis, degradation pathways and the mechanism of signal transduction in the fungal system.

Keywords: nitric oxide, cyclic guanosine monophosphate, nitric oxide synthetase, flavohemoglobin, nitric oxide responsive element

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Zhejiang Province Public Technology Research of agricultural projects (2011C22008) and by the Zhejiang Province Priority Themes (2011C12022)

* Corresponding author. Tel: +86-571-86404073; E-mail: sungc01@sina.com

Received: 10 August 2012 / Revised: 15 October 2012

《微生物学报》审稿程序

问: 贵刊的审稿程序是怎样的? 一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答: 本刊严格遵守“三审制”, 即: 编辑部内审, 专家外审, 主编总审。从投稿日期开始, 争取在 2 个月之内给出审稿结果, 3-6 个月之内发表。

(1) 收到来稿后, 首先要由编辑初审, 通过后再送外审。将请 2 位专家进行审阅, 再送主编进行最后的总审, 这个过程一般不会超过 2 个月。如果初审 2 位专家的意见分歧较大, 编辑部将再请第 3 位专家进行初审, 之后再送主编总审, 那么此稿的审理时间可能会超过 2 个月。

(2) 完成审稿后 (即主编给出总审意见), 编辑会给作者发出 E-mail 告知修改意见 (包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后, 经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者, 在没有完成全部审稿之前, 不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。