

全基因组水平扫描鉴定粗糙脉孢菌糖转运蛋白及其在酿酒酵母己糖发酵中的评价

高婧芳^{1,2}, 王邦^{2,3}, 韩晓云¹, 田朝光²

1 黑龙江大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150080

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

3 温州医科大学眼视光学院、医院 眼视光学和视觉科学国家重点实验室培育基地 卫生部视觉科学研究重点实验室, 浙江 温州 325027

高婧芳, 王邦, 韩晓云, 等. 全基因组水平扫描鉴定粗糙脉孢菌糖转运蛋白及其在酿酒酵母己糖发酵中的评价. 生物工程学报, 2017, 33(1): 79–89.

Gao JF, Wang B, Han XY, et al. Genome-wide screening of predicted sugar transporters in *Neurospora crassa* and the application in hexose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Chin J Biotech, 2017, 33(1): 79–89.

摘 要: 木质纤维素降解真菌粗糙脉孢菌天然具有吸收利用多种单糖和寡糖的能力, 但是目前基因组中注释的预测糖转运蛋白仍然有过半功能未知。本研究从全基因组水平系统分析了粗糙脉孢菌预测糖转运蛋白的转运底物。研究发现两个转运蛋白 (NCU01868 和 NCU08152) 具有转运多种己糖底物的功能, 因此分别命名为 NcHXT-1 和 NcHXT-2。利用荧光共振能量转移技术 (FRET) 确认了 NcHXT-1/-2 具有葡萄糖转运功能。在己糖转运蛋白全缺酿酒酵母 EBY.VW4000 中分别过表达 NcHXT-1/-2, 能恢复其在葡萄糖、半乳糖或甘露糖的液体培养基中生长并生成乙醇的能力。NcHXT-1/-2 在很多纤维素降解真菌中均具有保守的同源蛋白。本研究通过全基因组扫描鉴定, 发现了两个保守的丝状真菌己糖转运蛋白, 为真菌降解利用木质纤维素及酵母利用单糖发酵提供了新的改造靶点。

关键词: 粗糙脉孢菌, NcHXT-1, NcHXT-2, 己糖转运

Received: July 29, 2016; **Accepted:** September 26, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31670042), Key Project of Tianjin (No. 11ZCZDSY08900)

Corresponding authors: Xiaoyun Han. E-mail: zbjnefu@126.com

Chaoguang Tian. Tel: +86-22-84861947; Fax: +86-22-84861948; E-mail: tian_cg@tib.cas.cn

国家自然科学基金(No. 31670042), 天津专项(No. 11ZCZDSY08900)资助。

网络出版时间: 2016-09-29

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20160929.1013.001.html>

Genome-wide screening of predicted sugar transporters in *Neurospora crassa* and the application in hexose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*

Jingfang Gao^{1,2}, Bang Wang^{2,3}, Xiaoyun Han¹, and Chaoguang Tian²

¹ College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, Heilongjiang, China

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

³ School of Ophthalmology and Optometry, Eye Hospital, Wenzhou Medical University, State Key Laboratory Cultivation Base and Key Laboratory of Vision Science, Ministry of Health and Zhejiang Provincial Key Laboratory of Ophthalmology and Optometry, Wenzhou 325027, Zhejiang, China

Abstract: The lignocellulolytic filamentous fungus *Neurospora crassa* is able to assimilate various mono- and oligo-saccharides. However, more than half of predicted sugar transporters in the genome are still waiting for functional elucidation. In this study, system analysis of substrate spectra of predicted sugar transporters in *N. crassa* was performed at genome-wide level. NCU01868 and NCU08152 have the capability of uptaking various hexose, which are named as NcHXT-1 and NcHXT-2 respectively. Their transport activities for glucose were further confirmed by fluorescence resonance energy transfer analysis. Over-expression of either NcHXT-1 or NcHXT-2 in the null-hexose-transporter yeast EBY.VW4000 restored the growth and ethanol fermentation under submerged fermentation with glucose, galactose, or mannose as the sole carbon source. NcHXT-1/-2 homologues were found in a variety of cellulolytic fungi. Functional identification of two filamentous fungal-conserved hexose transporters NcHXT-1/-2 via genome scanning would represent novel targets for ongoing efforts in engineering cellulolytic fungi and hexose fermentation in yeast.

Keywords: *Neurospora crassa*, NcHXT-1, NcHXT-2, hexose transport

丝状真菌粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* 作为古老的遗传学模式生物，又是天然的纤维素快速降解菌^[1-2]。粗糙脉孢菌能分泌一系列的木质纤维素酶，将高聚化的植物细胞壁降解为可溶解、易利用的简单糖类，如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖以及各种寡糖，包括纤维寡糖（二糖、三糖等）和木寡糖^[3]。细胞欲利用这些混合糖，首先必须拥有丰富的糖转运蛋白库以吸收这些膜不透性营养分子。纤维寡糖转运蛋白 CDT-1、CDT-2 的分子功能首次在粗糙脉孢菌中被解析^[4]。CDT 的同源蛋白在其他丝状真菌中也陆续被报道，包括里氏木霉的 Crt-1 和草酸青

霉的 CdtC、CdtD 及 CdtG^[5-6]。这些纤维寡糖转运蛋白（或感应蛋白）不仅对于本源宿主菌的纤维素酶表达调控具有重要的生理意义^[7-8]，而且在纤维素燃料的生产中也有着非常显著的应用价值^[2-9]。粗糙脉孢菌五碳糖转运蛋白亦有多个被报道，包括 An25、XAT-1、XYT-1、LAT-1 等^[10-12]。然而，粗糙脉孢菌葡萄糖转运蛋白目前仅有 GLT-1 被鉴定^[11]，其在木质纤维素条件下表达水平很低^[13]。葡萄糖是木质纤维素降解混合物中最主要的成分之一，所占比重为 30%–40%^[13]。粗糙脉孢菌利用纤维素基葡萄糖与葡萄糖转运元件发挥功能密不可分。

基于序列比对和结构域预测,粗糙脉孢菌全基因组约有 39 个假定糖转运蛋白^[11]。除了上文介绍的纤维寡糖、戊糖转运蛋白及 GLT-1,还有少量其他糖转运蛋白被鉴定,包括半乳糖醛酸转运蛋白 GAT-1^[14]、纤维二糖酸转运蛋白 CBT-1/CLP-1^[15-16]以及葡萄糖感应蛋白 RCO-3^[17]。基于己糖转运蛋白全缺酿酒酵母 EBY.VW4000 (下文简称 EBY) 的生长互补实验,我们测试了剩余所有预测糖转运蛋白的己糖转运功能;发现了两个转运蛋白 NcHXT-1 (NCU01868) 和 NcHXT-2 (NCU08152) 具有转运多种己糖的功能。随后通过荧光共振能量转移技术验证了其葡萄糖转运功能。在 EBY 中分别过表达 NcHXT-1/-2,能够恢复 EBY 酵母细胞在多种己糖上的生长并生成乙醇的能力,表明了 NcHXT-1/-2 具有潜在的应用价值。NcHXT-1/-2 在纤维素降解丝状真菌中具有较高的保守性,且与酿酒酵母的己糖转运蛋白显著不同,其在丝状真菌降解利用纤维素过程中的作用值得进一步探索。

1 材料与方法

1.1 菌种、培养基及培养条件

粗糙脉孢菌野生型 (FGSC2489) 购自国际真菌遗传资源保藏中心 (Fungal genetics stock center)。粗糙脉孢菌预先在 Vogel's 盐^[18]加 2.0% 蔗糖的斜面上 28℃ 暗培养 1-2 d,随后放置在恒定光照条件下 6-8 d 以获得足够的孢子。液体培养时,以 10^6 个/mL 的孢子终浓度接入含有 100 mL Vogel's 盐加 2.0%蔗糖的三角瓶中,25℃、200 r/min 培养 16 h。随后,用无菌六层纱布过滤,并用无菌水迅速洗涤菌丝 5 次,转接入 100 mL 无碳源或者 2.0%葡萄糖作为碳源的 Vogel's 盐液体培养基,25℃、200 r/min 诱

导处理 1 h,抽滤收样,立即用液氮冷冻,存于 -80℃,以备 RNA 提取使用。

酿酒酵母 EBY.VW4000 菌株^[19]来自于法兰克福大学教授 Eckhard Boles 的馈赠。此菌株可在 YPM (1.0%酵母提取物、2.0%蛋白胨、2.0%麦芽糖、2.0%琼脂可选) 培养基上生长。对于 EBY.VW4000 的重组菌,使用含缺少尿嘧啶 (Ura⁻) 的氨基酸混合物 (Drop-out amino acids) 的全合成培养基培养 (Synthetic complete medium, SC),以葡萄糖、半乳糖、果糖、山梨糖或麦芽糖作为唯一碳源 (2.0%琼脂可选)。对于生长互补实验,挑单克隆重组酵母于 30℃ 摇床培养过夜至菌体 OD_{600} 为 0.8-1.5,离心收集菌体 (4 000 r/min, 5 min),用无菌水洗 3 次,重悬至 OD_{600} 为 0.25-0.30,等梯度稀释菌液 (10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2})。将等梯度稀释的酵母点在以 2.0%麦芽糖 (或葡萄糖、半乳糖、山梨糖、果糖等) 为唯一碳源的 SC (Ura⁻) 平板中,置于 28℃ 培养箱中培养 3 d (麦芽糖) 或 6 d (其他碳源),用佳能相机 (Canon EOS207, 日本) 拍照记录。

1.2 RNA 提取与 cDNA 合成

总 RNA 提取用 Trizol 试剂 (Invitrogen, 美国),并用 DNase (RNeasy Mini kit, Qiagen, 德国) 纯化以除去基因组污染。RNA 浓度用 Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, 美国) 测定,并用琼脂凝胶电泳检测 RNA 的完整性。合格的 RNA 用以反转录合成 cDNA,反转录参照 ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO, 日本)。

1.3 质粒构建

对于糖转运蛋白重组质粒的构建,以粗糙脉孢菌 cDNA 作为模板,以含有 *Spe* 和 *EcoR* 酶切位点的引物 PCR 扩增获得目的片段

(NCU06026 和 NCU04310 除外, 分别用 *Bam*H / *Hind* 和 *Bam*H / *Eco*R)。用 *Spe* 和 *Eco*R 双酶切的质粒 pRS424-GFP^[4] 作为骨架, 连接 PCR 产物, 获得重组质粒, 所有克隆均通过测序确认序列正确。

荧光共振能量转移检测质粒 pDRf1-2 μ Δ 13 购买自 Addgene。该质粒的表达产物——葡萄糖感应蛋白的 N 和 C 端分别融合了 CFP 和 YFP, 当感应蛋白结合葡萄糖时, 会发生构象改变, 使得 CFP 和 YFP 相互靠拢, 进而满足发生荧光共振的距离, CFP 的荧光激发 YFP 产生二次荧光^[20-21]。空载质粒 pDRf1 作为实验阴性对照。文中转运蛋白重组质粒 pRS424-NcHXT-1/NcHXT-2/GLT-1 与 pDRf1-2 μ Δ 13 质粒共表达的 EBY.VW4000 简称为 NcHXT-1/NcHXT-2/GLT-1+pDRf1-2 μ Δ 13 重组菌。

1.4 显微拍照

重组酿酒酵母培养过夜至 OD_{600} 为 0.8–1.5, 离心收集菌体并用 ddH₂O 洗一次, 重悬于 PBS 缓冲液中, 使用荧光显微镜 (OLYMPUS, 日本) 观察拍照。

1.5 荧光共振能量转移 (FRET) 测试

将连有糖转运蛋白基因的 pRS424 质粒和 pDRf1-2 μ Δ 13 质粒共转入酿酒酵母 EBY.VW4000 中, 在含 2.0% 麦芽糖的 SC (Ura⁻Trp⁻) 的平板上生长 2–3 d, 挑单克隆到 5 mL 麦芽糖 SC (Ura⁻Trp⁻) 液体培养基的试管中, 30、220 r/min 培养过夜。过夜培养到细胞对数生长阶段 (OD_{600} 为 0.5–1.0)。用新鲜的缺乏任何碳源的 SC (Ura⁻Trp⁻) 培养基洗细胞两次, 并重悬收获的细胞, 在 30、220 r/min 饥饿培养 8 h, 即可用于测试 FRET^[21]。FRET 测试时, 用 MES 缓冲液

重悬细胞, 调整 OD_{600} 至 0.75, 用 infinite 200Pro 测量荧光信号, 设定激发波长 428 nm、发射波长 460–570 nm (步幅 5 nm)。向加 180 μ L 的 MES 细胞悬浊液中加入 20 μ L 100 mmol/L 葡萄糖溶液, 迅速充分混匀, 测定 3 个循环 (每个循环约 15 min)。对照是加入 20 μ L MES 缓冲液。CFP 和 YFP 的荧光信号分别用最大吸收峰对应的发射波长 485 nm 和 525 nm 表示^[21]。 $F_{525\text{ nm}}/F_{485\text{ nm}}$ 越大, 表示 YFP 相对 CFP 的荧光信号增强, 因此葡萄糖 $[F_{525\text{ nm}}/F_{485\text{ nm}}]/\text{MES}[F_{525\text{ nm}}/F_{485\text{ nm}}]$ 的比值变化能表示添加葡萄糖前后, 因葡萄糖感应蛋白结合葡萄糖而产生的 CFP 荧光向 YFP 转移的过程^[21]。

1.6 重组酿酒酵母发酵

先将 NcHXT-1+pDRf1-2 μ Δ 13 和 NcHXT-2+pDRf1-2 μ Δ 13 重组菌在麦芽糖 SC (Ura⁻Trp⁻) 的液体培养基上培养过夜至 OD_{600} 为 0.6–1.0, 用无菌水洗两次, 重悬在一定体积无菌水中。将重悬的细胞分别接到含 2.0% 的葡萄糖、半乳糖或甘露糖的 SC (Ura⁻Trp⁻) 的液体培养基中, 使 OD_{600} 值约为 0.5, 放入 30 摇床, 220 r/min 培养。每隔一定时间取样一次, 测 OD_{600} 值, 离心, 上清用带有示差检测器和 Aminex HPX-87H 色谱柱 (Bio-Rad, 美国) 的高效液相色谱仪 (Waters, 英国) 检测培养基残糖和乙醇含量。色谱柱在 45、5 mmol/L 硫酸作为流动相, 以 0.5 mL/min 流速工作。

1.7 遗传进化树构建

以转运蛋白序列 NcHXT-1 和 NcHXT-2 (<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html>) 进行 BLASTp 搜索, 比对来自 NCBI 或 JGI 的物种的全基因组蛋

白序列: *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium oxalicum*, *Trichoderma reesei*, *Talaromyces marneffeii*, *Myceliophthora thermophila*。每个得分最高且具有 identity > 40%、E-value < 1E-10、coverage > 60%的靶标序列, 则被视为同源性较高的候选蛋白。取酿酒酵母的己糖转运蛋白作为 out-group。将以上所有蛋白序列用 ClustalW^[22]进行多序列比对。然后用 MEGA 5.2^[23]以最大似然法构建进化树, 并做 1 000 次自举检验。

1.8 数据作图与统计分析

数据作图使用微软办公软件 Excel 2013。除特别标注, 文中所有显著性统计分析采用双尾 Student's *t*-test。*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 粗糙脉孢菌假定糖转运蛋白克隆

通过预测发现粗糙脉孢菌全基因组共有 39

个糖转运蛋白^[11], 除文献报道外, 仍然有 21 个功能未知 (图 1)。依据这 21 个候选转运蛋白在葡萄糖及无碳源条件下的表达水平 (图 1), 我们使用 cDNA 模板成功克隆了其中 17 个基因的开放阅读框 (图 1, 其中 NCU06358 和 NCU07861 通过 cDNA 模板扩增, 没有获得阳性条带; NCU07054 和 NCU08180 几乎不表达)。

2.2 酿酒酵母 EBY.VW4000 重组菌株的表型分析

酿酒酵母 EBY.VW4000 (下文简称 EBY) 缺失了所有的己糖转运蛋白, 因此不能在以己糖为唯一碳源的培养基上生长^[19]。如果某转运蛋白具有己糖转运的功能, 那么过表达该转运蛋白能够恢复 EBY.VW4000 在己糖上的生长能力。基于此方法, 我们一一测试了克隆成功的 17 个糖转运蛋白。结果表明, 两个假定糖转运蛋白 (NCU01868 和 NCU08152) 能回补 EBY.VW4000 在葡萄糖或半乳糖上的生长缺陷 (图 2)。

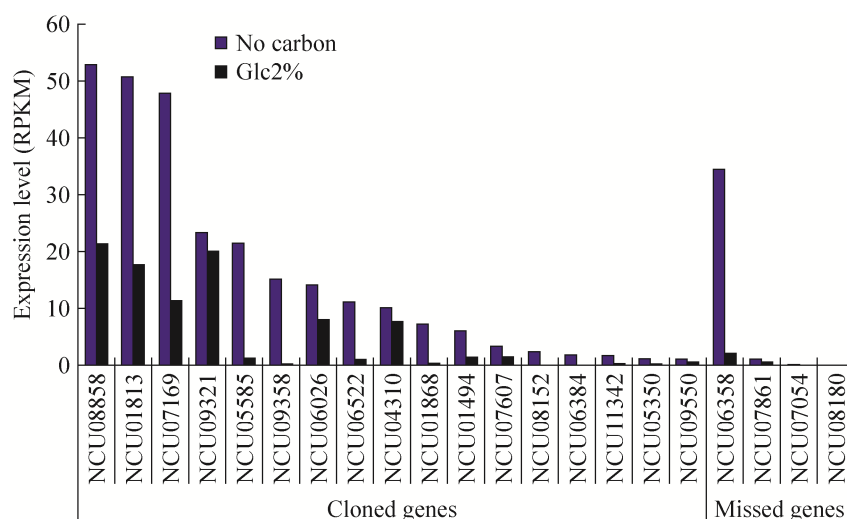


图 1 21 个预测糖转运蛋白在 2.0% 葡萄糖和无碳源条件下的表达值

Fig. 1 Expression levels of 21 predicted sugar transporters on 2.0% glucose and carbon-free conditions. RPKM: reads per kilobase per million mapped reads.

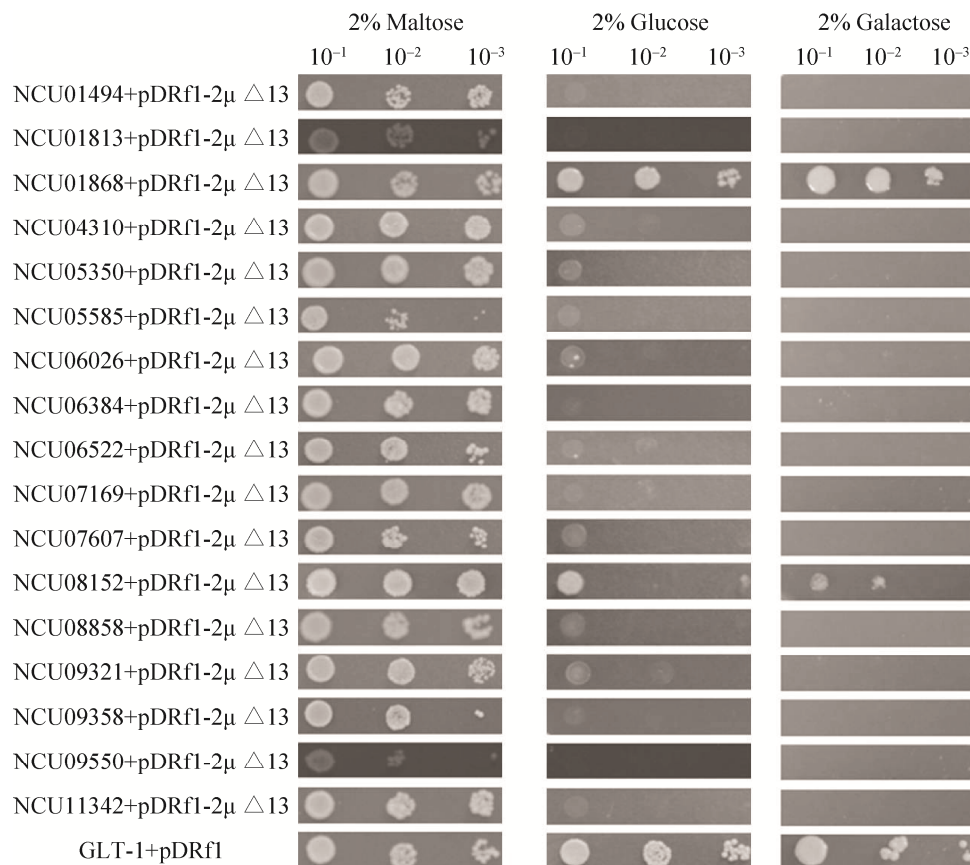


图 2 17 个预测糖转运蛋白的 EB.Y.VW4000 重组菌株在葡萄糖和半乳糖上的表型分析

Fig. 2 Complementary growth of EB.Y.VW4000 harboring one of 17 predicted sugar transporters on glucose and galactose. The glucose transporter GLT-1 represents a positive control.

我们进一步测试了含有这两个转运蛋白的 EB.Y 重组菌在其他碳源上的生长能力, 包括果糖、甘露糖、山梨糖。结果表明, 重组菌株在这些糖上均能生长 (图 3A), 表明 NCU01868 和 NCU08152 能转运各种己糖底物。同时, 融合 GFP 荧光定位显示两者均能定位到细胞膜上, 说明两者是质膜转运蛋白 (图 3B)。因此, 我们将 NCU01868 和 NCU08152 分别命名为 NcHXT-1/-2 (*Neurospora crassa* HeXose Transporter 1/2)。

2.3 利用荧光共振能量转移技术评价 NcHXT-1/-2 的葡萄糖转运功能

基于荧光共振能量转移技术的葡萄糖感

应蛋白, 能够实时、灵敏地检测葡萄糖的吸收^[24]。利用此技术, 我们将 pDRf1-2μ Δ13 质粒分别与 pRS424-NcHXT-1/NcHXT-2 共转化到 EB.Y.VW4000 中以验证 NcHXT-1/-2 的转运功能 (图 4A)。测试结果表明, 当向培养基中添加葡萄糖时, 在表达有 NcHXT-1/-2 的细胞中, 葡萄糖 $[F_{525\text{ nm}}/F_{485\text{ nm}}]/\text{MES}[F_{525\text{ nm}}/F_{485\text{ nm}}]$ 比值显著增大 (图 4B), 其中 485 nm 是 CFP 的最大发射波长, 525 nm 是 YFP 的最大发射波长, 表明胞内发生了 CFP 荧光能量向 YFP 荧光的转移。以上实验进一步证实了 NcHXT-1/-2 具有葡萄糖转运功能。

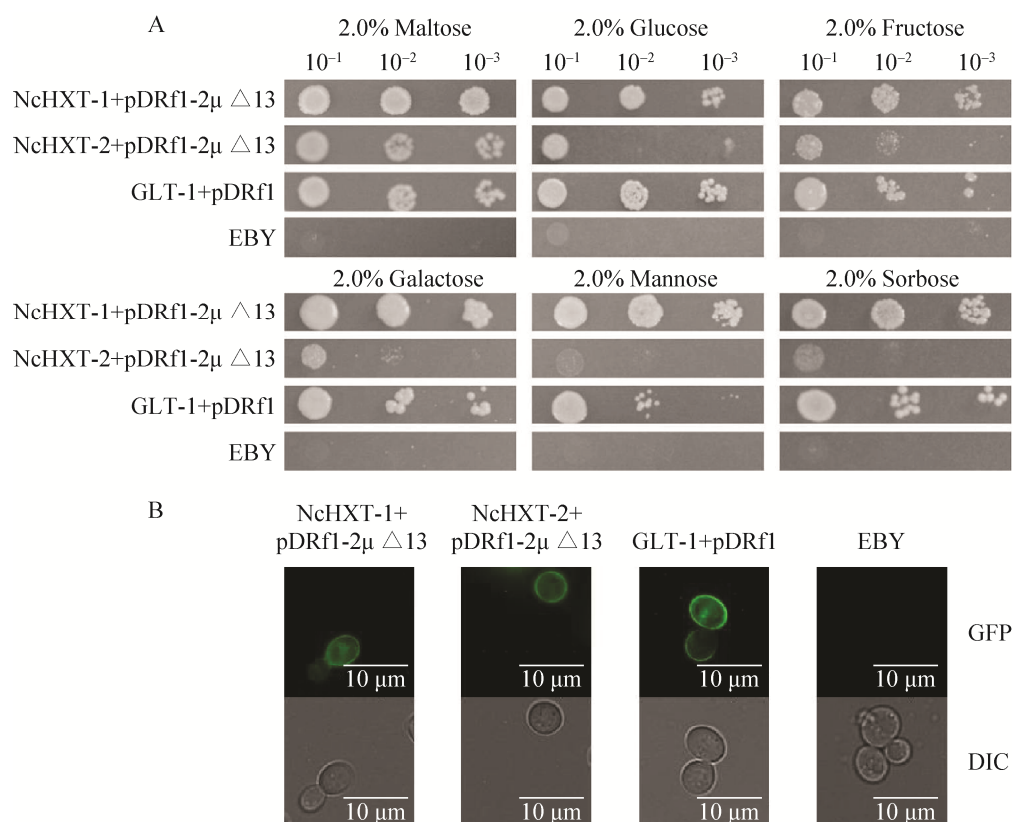


图 3 NcHXT-1/-2 EB.YV4000 重组菌株在多种己糖底物上的表型分析及其亚细胞定位

Fig. 3 Complementary growth of EB.YV4000 harboring NcHXT-1/-2 on multiple hexose sources (A) and its subcellular localization (B). The glucose transporter GLT-1 represents a positive control, EB.YV.4000 as a negative control.

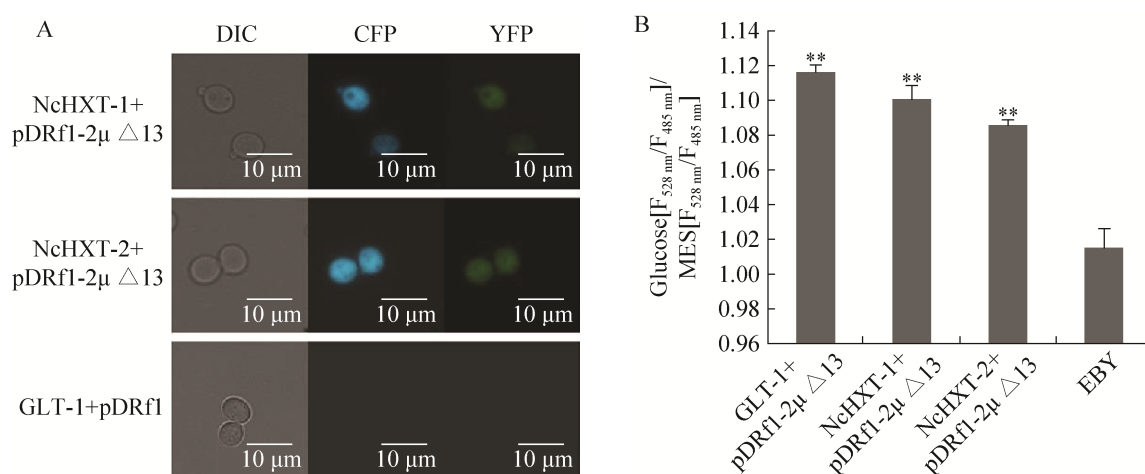


图 4 基于荧光共振能量转移技术检测 NcHXT-1/-2 的葡萄糖转运功能

Fig. 4 Fluorescence resonance energy transfer analysis of NcHXT-1/-2. (A) The CFP and YFP of pDRf1-2μ Δ13 were successfully detected in recombinant EB.YV4000. (B) [F_{528 nm}/F_{485 nm}]/MES[F_{528 nm}/F_{485 nm}] of recombinant EB.YV4000 strain harboring various sugar transporter, using the EB.YV4000 as the control.

2.4 过表达 NcHXT-1/-2 酵母的发酵测试

我们分别进一步测试了过表达 NcHXT-1/-2 的 EBY 重组菌株在葡萄糖、半乳糖、甘露糖中的糖消耗及发酵能力。两个己糖转运蛋白均能支持 EBY 在 3 种单糖中的生长 (图 5 和图 6),

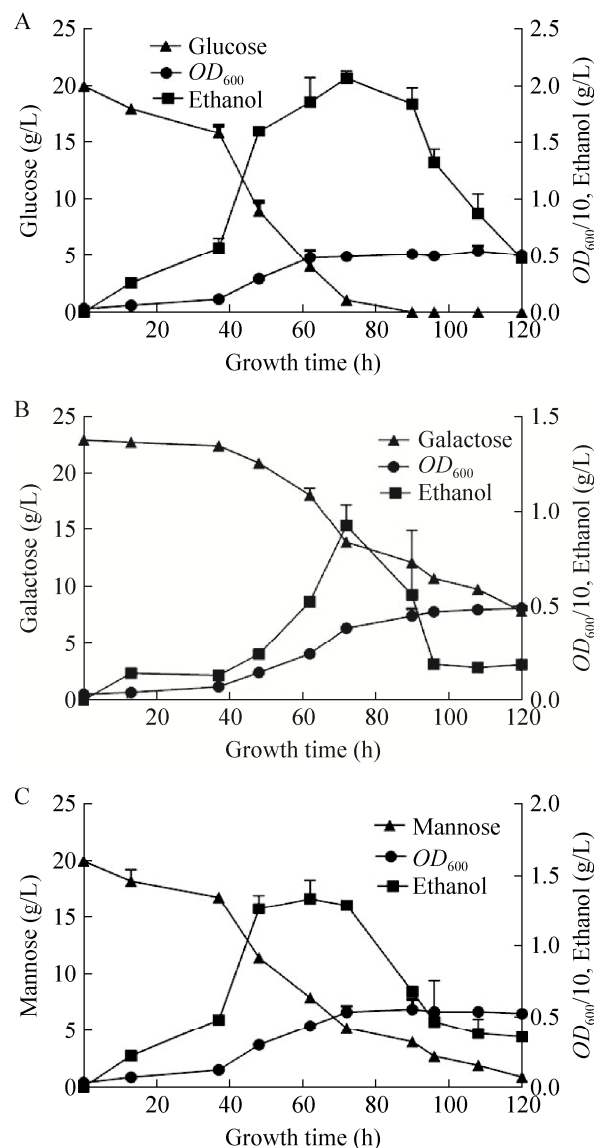


图 5 NcHXT-1 EBY 重组菌株在葡萄糖 (A)、半乳糖 (B) 和甘露糖 (C) 条件下的液体培养和发酵

Fig. 5 Submerged growth and fermentation of EBY strain harboring NcHXT-1 on glucose (A), galactose (B) and mannose (C).

与平板生长实验结果吻合 (图 3A)。过表达 NcHXT-1 的 EBY 酵母在 3 种己糖上的生物量积累很相似;但是糖消耗速率方面,葡萄糖>甘露糖>半乳糖,尤其是半乳糖显著慢于其他两者 (图 5)。同时,在半乳糖上,产乙醇更慢且更易

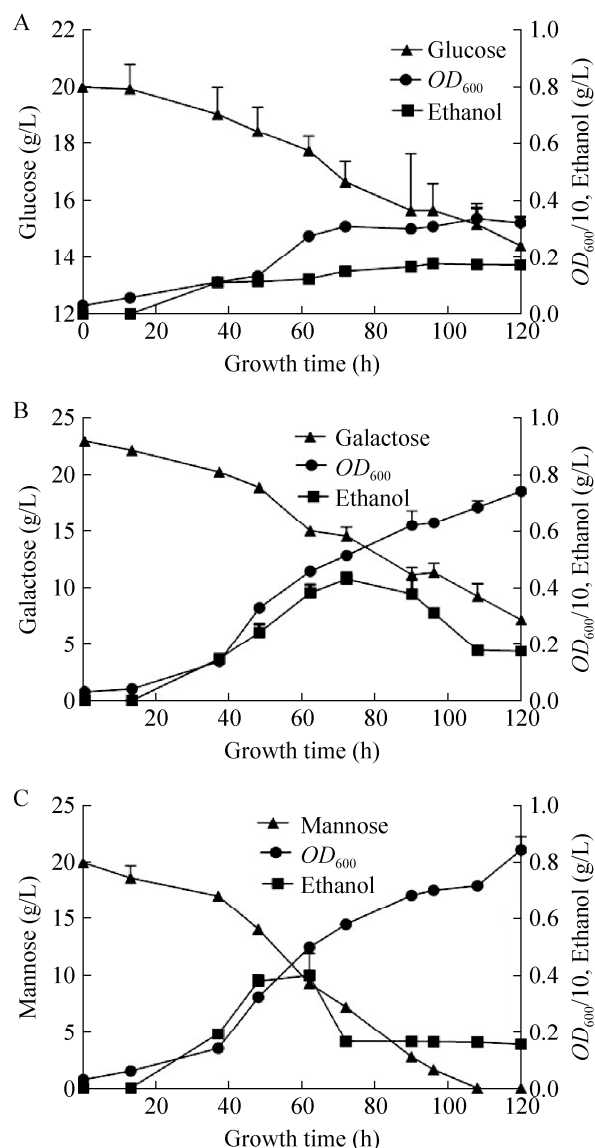


图 6 NcHXT-2 EBY 重组菌株在葡萄糖 (A)、半乳糖 (B) 和甘露糖 (C) 条件下的液体培养和发酵

Fig. 6 Submerged growth and fermentation of EBY strain harboring NcHXT-2 on glucose (A), galactose (B) and mannose (C).

被当作碳源利用 (图 5)。过表达 NcHXT-2 的 EBY 酵母在葡萄糖上生长反而最差, 糖消耗方面的快慢顺序为: 甘露糖>半乳糖>葡萄糖 (图 6), 表明 NcHXT-2 更加偏好转运甘露糖。过表达 NcHXT-2 的菌株在各种己糖条件下生产乙醇最高产量均没有过表达 NcHXT-1 在相应己糖底物上高 (图 5 和图 6), 表明在酿酒酵母中, NcHXT-1 比 NcHXT-2 具有更高的乙醇发酵的应用潜力。有趣的一点是, 在半乳糖和甘露糖上, 含有 NcHXT-2 比含有 NcHXT-1 的重组菌具有更高的菌体生长浓度 (5B、5C、6B、6C), 推测被 NcHXT-2 转运进入胞内的己糖, 碳分

流并没有过多地用于生成乙醇, 而是用于合成细胞。

2.5 NcHXT-1/-2 的遗传进化树分析

粗糙脉孢菌己糖转运蛋白 NcHXT-1/-2 在许多丝状真菌中具有较高的保守性, 这些丝状真菌包括曲霉、里氏木霉、草酸青霉、嗜热毁丝霉以及病原菌镰刀菌、黄色霉菌等 (图 7)。NcHXT-2 的同源蛋白之间比 NcHXT-1 的同源蛋白之间更加保守, 但是两个同源家族之间的亲缘关系并不近 (图 7)。NcHXT-1/-2 的同源蛋白与酿酒酵母的己糖转运蛋白相似性较低, 表明丝状真菌己糖转运蛋白家族进化的多样性。

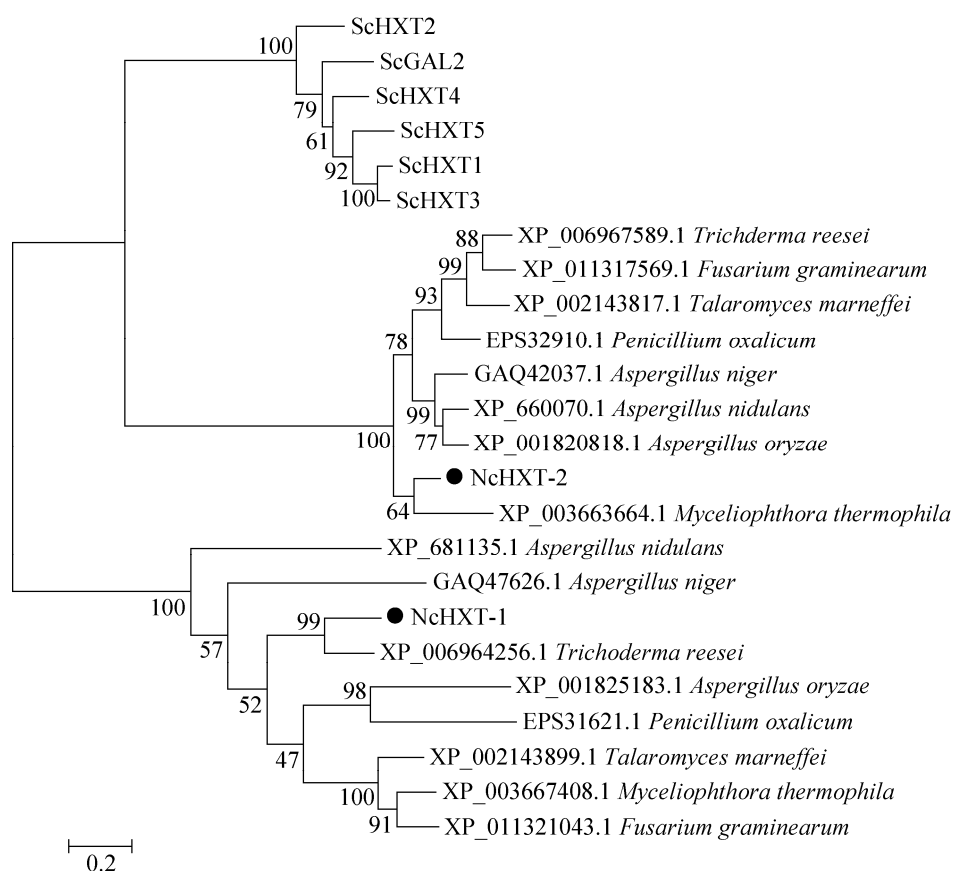


图 7 NcHXT-1/-2 的遗传进化树分析

Fig. 7 Maximum likelihood phylogenetic analysis of fungal orthologs of NcHXT-1/-2.

3 讨论

由于粗糙脉孢菌天然具有降解利用木质纤维素的能力,并拥有丰富的糖转运蛋白基因库^[11]。因此本研究在全基因组范围内搜索了纤维素降解丝状真菌粗糙脉孢菌的己糖转运蛋白,发现并功能表征了两个新的己糖转运蛋白 NcHXT-1 和 NcHXT-2。NcHXT-1/-2 与酿酒酵母己糖转运蛋白序列相似度很低(图 7),推测粗糙脉孢菌与酿酒酵母腐生环境的差别,导致了前者多样的己糖转运蛋白库^[25]。NcHXT-1/-2 均能够支持己糖转运蛋白全缺失酵母 EBY.VW4000 在葡萄糖、半乳糖及甘露糖上发酵产乙醇(图 5 A-C 和图 6 A-C),预示 NcHXT-1/-2 具有潜在的应用价值。特别值得注意的是,过表达 NcHXT-2 的 EBY 重组菌株利用甘露糖比葡萄糖、半乳糖显著更快,且利用彻底(图 6),表明 NcHXT-2 对甘露糖的亲合力较后两者更高,这在混合糖的选择利用方面有一定的应用价值^[26]。

糖转运是纤维素真菌利用木质纤维素降解产物的第一步。糖转运蛋白不仅是真菌细胞吸收外界可溶糖的关键元件,同时在纤维素酶表达调控中起着重要作用^[5,7,16]。尽管 NcHXT-2 在纤维素或葡萄糖条件下的表达水平都不高(图 1),我们前期实验发现,敲除 NcHXT-2 能够影响粗糙脉孢菌的纤维素酶产量,表明 NcHXT-2 在纤维素酶表达中发挥着某种调控作用。NcHXT-1/-2 的同源蛋白在很多纤维素降解丝状真菌中均存在,包括曲霉、里氏木霉、草酸青霉、嗜热毁丝霉等,NcHXT-1/-2 对于这些丝状真菌调控纤维素酶表达、利用木质纤维素产物有怎样的作用值得进一步探索。

REFERENCES

- [1] Tian CG, Beeson WT, Iavarone AT, et al. Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(52): 22157–22162.
- [2] Lin LC, Li JG, Wang B, et al. Progress of lignocellulose degradation and utilization on model filamentous fungus *Neurospora crassa*. Chin J Bioprocess Eng, 2014, 12(1): 28–36 (in Chinese).
林良才, 李金根, 王邦, 等. 粗糙脉孢菌木质纤维素降解利用研究进展. 生物加工过程, 2014, 12(1): 28–36.
- [3] Glass NL, Schmoll M, Cate JHD, et al. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. Annu Rev Microbiol, 2013, 67(1): 477–498.
- [4] Galazka JM, Tian CG, Beeson WT, et al. Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. Science, 2010, 330(6000): 84–86.
- [5] Zhang WX, Kou YB, Xu JT, et al. Two major facilitator superfamily sugar transporters from *Trichoderma reesei* and their roles in induction of cellulase biosynthesis. J Biol Chem, 2013, 288(46): 32861–32872.
- [6] Li J, Liu GD, Chen M, et al. Cellodextrin transporters play important roles in cellulase induction in the cellulolytic fungus *Penicillium oxalicum*. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(24): 10479–10488.
- [7] Cai PL, Gu RM, Wang B, et al. Evidence of a critical role for cellodextrin transporter 2 (CDT-2) in both cellulose and hemicellulose degradation and utilization in *Neurospora crassa*. PLoS ONE, 2014, 9(2): e89330.
- [8] Znameroski EA, Li X, Tsai JC, et al. Evidence for Transceptor Function of Cellodextrin Transporters in *Neurospora crassa*. J Biol Chem, 2014, 289(5): 2610–2619.
- [9] 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.
- [10] Du J, Li SJ, Zhao HM. Discovery and characterization of novel D-xylose-specific

[1] Tian CG, Beeson WT, Iavarone AT, et al. Systems

- transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitis*. Mol Biosyst, 2010, 6(11): 2150–2156.
- [11] Li JG, Lin LC, Li HY, et al. Transcriptional comparison of the filamentous fungus *Neurospora crassa* growing on three major monosaccharides D-glucose, D-xylose and L-arabinose. Biotechnol Biofuels, 2014, 7(1): 31.
- [12] Li JG, Xu J, Cai PL, et al. Functional analysis of two L-arabinose transporters from filamentous fungi reveals promising characteristics for improved pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(12): 4062–4070.
- [13] Wang B, Cai PL, Sun WL, et al. A transcriptomic analysis of *Neurospora crassa* using five major crop residues and the novel role of the sporulation regulator *rca-1* in lignocellulase production. Biotechnol Biofuels, 2015, 8(1): 21.
- [14] Benz JP, Protzko RJ, Andrich JMS, et al. Identification and characterization of a galacturonic acid transporter from *Neurospora crassa* and its application for *Saccharomyces cerevisiae* fermentation processes. Biotechnol Biofuels, 2014, 7(1): 20.
- [15] Xiong Y, Coradetti ST, Li X, et al. The proteome and phosphoproteome of *Neurospora crassa* in response to cellulose, sucrose and carbon starvation. Fungal Genet Biol, 2014, 72: 21–33.
- [16] Cai PL, Wang B, Ji JX, et al. The putative cellodextrin transporter-like protein CLP1 is involved in cellulase induction in *Neurospora crassa*. J Biol Chem, 2014, 290(2): 788–796.
- [17] Madi L, McBride SA, Bailey LA, et al. *rco-3*, a Gene Involved in Glucose Transport and Conidiation in *Neurospora crassa*. Genetics, 1997, 146(2): 499–508.
- [18] Vogel HJ. A convenient growth medium for *Neurospora*. Microb Genet Bull, 1956, 13: 42–46.
- [19] Wieczorke R, Krampe S, Weierstall T, et al. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett, 1999, 464(3): 123–128.
- [20] Fehr M, Frommer WB, Lalonde S. Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensors. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(15): 9846–9851.
- [21] Bermejo C, Haerizadeh F, Takanaga H, et al. Optical sensors for measuring dynamic changes of cytosolic metabolite levels in yeast. Nat Protoc, 2011, 6(11): 1806–1817.
- [22] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res, 1994, 22(22): 4673–4680.
- [23] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [24] Bermejo C, Haerizadeh F, Takanaga H, et al. Dynamic analysis of cytosolic glucose and ATP levels in yeast using optical sensors. Biochem J, 2010, 432(2): 399–406.
- [25] Galagan JE, Calvo SE, Borkovich KA, et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Nature, 2003, 422(6934): 859–868.
- [26] Young EM, Tong A, Bui H, et al. Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(1): 131–136.

(本文责编 郝丽芳)