

烟曲霉几丁质酶基因的克隆与表达

王 颖 王俊琦 胡红焱 杨雪鹏 杨寿钧 余小应 金 城*

(中国科学院微生物研究所微生物资源国家重点实验室,北京 100080)

摘 要 Chi44 是烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*) YJ-407 产生的一种胞外几丁质酶。通过用真菌几丁质酶保守氨基酸序列与 Chi44 的 N-端序列检索烟曲霉部分基因组序列数据库,获得一个编号为 contig555 的烟曲霉基因组序列,可能包含烟曲霉几丁质酶的基因。根据检索结果用 RT-PCR 方法从烟曲霉 YJ-407 中克隆到 1.4kb 的 cDNA 片段,该 cDNA 的 ORF 编码一个 395 个氨基酸的蛋白,分子量为 43.6kD。对其推导氨基酸序列分析表明该蛋白与其它真菌来源的几丁质酶同源,而且活性中心与人巨噬细胞几丁质酶高度同源。该 cDNA 已在 *E. coli* 与 *Pichia pastoris* GS115 中获得表达,分别获得 43kD 和 44kD 的重组蛋白,两种重组蛋白均有几丁质酶活性。与野生酶相比,大肠杆菌表达的 43kD 重组酶及 *Pichia* 酵母表达的 44kD 重组酶稳定性下降,说明 Chi44 的糖基化修饰可稳定酶蛋白。

关键词 烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*), 几丁质酶(chitinase), cDNA, 表达, 稳定性

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0843-08

几丁质酶(chitinase, EC3.2.1.14)广泛存在于病毒、细菌、真菌、线虫、原生寄生虫、昆虫、植物和人体^[1-8],具有多种不同的功能。如细菌产生的几丁质酶起着获取营养的作用;而丝状真菌产生的几丁质酶则被认为参与诸如细胞壁溶解、孢子萌发、菌丝生长、菌丝自溶、孢子形成、几丁质同化及真菌寄生等过程^[7,9,10]。由于其在多种病原体中的重要作用,几丁质酶已成为药物开发的潜在靶分子^[5,11,12,13]。目前已报道了多种几丁质酶的抑制剂^[14,15],其中生物活性最好的是阿洛氨菌素(allosamidin)^[14],可抑制来源于所有病原体的几丁质酶。人体中也存在几丁质酶,可能起到防御含几丁质病原体的侵袭的作用^[8,16,17,18,19],该酶也受阿洛氨菌素的抑制。显然,阿洛氨菌素这样的广谱抑制剂如果用作抗感染药物将会在人体中产生副作用。因此对来源于病原体的几丁质酶的结构与功能研究不仅是理解几丁质酶作用机制的关键,也是开发设计对人无副作用的选择性抑制剂的基础。

烟曲霉是一种常见的、通过空气传播的腐生真菌,是一种条件致病真菌,可在因接受化疗、骨髓移植的病人或其他免疫缺损人群中引起肺炎或其它致死的侵袭性感染^[20,21]。目前,由烟曲霉引起的严重侵袭性曲霉病正呈上升趋势,因此对烟曲霉毒力因子及潜在药物靶分子的研究在近年来引起了广泛的

关注。虽然已知烟曲霉可分泌胞外几丁质酶^[22],但对烟曲霉几丁质酶的结构和生理功能却知之甚少。

我们从烟曲霉 YJ-407 中分离纯化了一个胞外几丁质酶,该酶的最适作用 pH 为 5.0,最适作用温度为 60℃,并发现该酶具有内切、外切及转糖基(transglycosyl)活性^[23]。该酶的独特作用方式使其能降解完整的几丁质。为进一步了解其独特作用方式的结构基础和探讨其在烟曲霉感染中的作用,我们从烟曲霉 YJ-407 中克隆了该几丁质酶的 cDNA,并分别在 *E. coli* 和 *Pichia pastoris* 中获得活性表达,初步分析了重组酶的特性。

1 材料与方 法

1.1 试剂

胶体几丁质按 Vyas 和 Deshpande 的方法制备^[23]。限制酶、Taq DNA polymerase 和 T4 连接酶购自 TaKaRa; IPTG、X-gal、DEPC 和 PNP-chitohexaose 购自 Sigma;糖链结构测定试剂与酶来源于 Glyko 公司与 Calbiochem-Novabiochem 公司。其它试剂均为分析纯。由 *Aspergillus fumigatus* YJ-407 产生的野生几丁质酶 Chi44(纯酶比活 5.64u/mg)按 Xia 等报道的方法制备^[23]。

1.2 菌株与质粒

烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* YJ-407 由中国微生

收稿日期:2004-03-31,修回日期:2004-06-28。

基金项目:本研究由中国科学院创新项目(KSCX2-3-02-01)和国家重大基础研究规划前期研究专项(No.2001CCA00100)资助。

* 通讯作者。 Tel:86-10-62587206; Fax: 86-10-62653468; E-mail: jinc@sun.im.ac.cn

物保藏中心保存(CGMCC 0386)。 *E. coli* DH5 α 购自 Bethesda Research Laboratories; *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 表达载体 pET-15b 购自 Novagen。 *Pichia* GS115 与表达载体 pPIC9 来源于 Invitrogen 公司。

1.3 烟曲霉 YJ-407 mRNA 的分离

将烟曲霉孢子接种到 100 mL 土豆葡萄糖培养基中, 35℃, 200 r/min 培养 24h 后过滤收集菌丝; 菌丝用无菌水冲洗后重悬于 100 mL 产酶培养基(1% milled flake chitin, 0.05% peptone, 0.05% yeast extract, 0.1% glucose, 0.03% KH₂PO₄, 0.07% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.001% FeSO₄·7H₂O, 0.0001% ZnSO₄, pH 5.0) 中, 于 32℃ 继续培养 6h。将培养液于 6 000 × g 离心 15min, 所收集的菌丝用于 mRNA 的提取。mRNA 用液氮和 RNease® Plant Mini kit (QIAGEN Sci., Maryland, USA) 提取, 单链 cDNA 用 TaKaRa 生物技术公司的 mRNA selective PCR Kit 制备。

1.4 全长 cDNA 的分离

根据检索结果设计了上游引物: 5'-GCTAGCTC-CGGTTATCGCTCG-3'; 下游引物为 oligo (dT)₁₅-RA。以单链 cDNA 为模板进行 30 个循环的 PCR 反应, 100 μ L 反应体系中含上、下游引物各 100 pmol 和 5 u 的 AMV-optimized Taq DNA polymerase, 反应条件为: 85℃, 1 min; 50℃, 1 min; 72℃, 1 min。将所获得的 1.2kb DNA 扩增片段克隆到 pGEM-T 载体中, 重组质粒被命名为 pGEM-chi。经测序证明所克隆的片段为烟曲霉 YJ-407 几丁质酶的全长 cDNA。

1.5 几丁质酶在 *E. coli* 中的表达与纯化

以 pGEMT-chi 为模板进行 PCR 扩增, 所用引物为 PE1: 5'-CTCCATGG CTAGCTCCGGTTATCGCT-3' 和 PE2: 5' GCGGATCCTTAGGTTTGCATGCCATTGCGC-3', Nco I 和 BamH I 位点被分别引入到两个引物的 5'-端。将 PCR 产物克隆到 pET-15b 的 Nco I 和 BamH I 位点, 经酶切鉴定和序列分析确定片段以正确的读码框插入到载体的下游, 命名为 pET-chi。

将 1L IPTG 诱导的大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS/pET-chi 的发酵液离心, 收集菌体重悬于 40mL 0.2mol/L 醋酸缓冲液中, 然后用超声破碎细胞并离心去除细胞碎片。以硫酸铵沉淀上清液, 收集 30% ~ 60% 饱和度的沉淀, 将其溶解在 10mL 的 50mmol/L 的 Tris-HCl II (pH8.0) 缓冲液中。用 3L 的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0) 过夜透析。用 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液平衡 DEAE-纤维素柱 (HiPrep 16/10

DEAE FF), 用一柱体积的相同缓冲液洗脱除去未结合蛋白, 再用含 0 ~ 1mol/L NaCl 线性梯度的 50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0) 洗脱。合并含有酶活的部分洗脱液, 冻干后将蛋白重悬于 500 μ L 0.2mol/L (pH5.0) 的醋酸缓冲液中, 进一步用 SuperdexG-75 (Superdex-G75HR10/30 3000-70000) 纯化, 收集洗脱液备用, 以做进一步分析。此纯化过程采用 AKTA FPLC (Amersham Pharmacia Biotech) 层析分离系统。

1.6 几丁质酶在酵母菌中的表达及其纯化

以 pGEM-chi 为模板进行 PCR 扩增, 所用上游引物含有 Xho I 位点 (5'-TCTCTCGAGAAAAGAGCTAG-CTCCGGTTATCGCTCG-3'), 下游引物含有 EcoR I 位点 (5'-GCGAATTCCTTAGGTTTGCATGCCATT GCGC-3')。为使 pPIC9 上的 α 因子信号肽有正确的切割位点, 在上游引物的 Xho I 和成熟蛋白的第一个密码子之间引入两个密码子 (AAA AGA-Lys Arg)。PCR 产物经 Xho I 和 EcoR I 酶切后连接到 pPIC9 质粒中, 命名为 pPIC-chi。酶切鉴定和序列分析表明插入片段为几丁质酶 cDNA。

pPIC-chi 经 Sal I 线性化处理后, 电转化到酵母菌 GS115 中。经 72h 甲醇诱导后, 收集 300mL 的发酵液, 经超滤膜浓缩 10 倍 (截流分子量 10kD) (Millipore)。浓缩的上清液在 50℃ 加热 10min, 离心收集上清。采用硫酸铵沉淀蛋白, 收集 30% ~ 60% 饱和度的蛋白沉淀。将蛋白重悬于 7 mL 0.2mmol/L 的醋酸缓冲液。透析后, 将重组酶冻干。

1.7 酶活测定及其蛋白质分析

在 2mL 酶活测定反应体系中含 1% 胶体几丁质, 20mmol 醋酸缓冲液 (pH5.0) 和适量的酶。在 37℃ 反应 20min。反应结束后煮沸 5min 以终止酶促反应。加入 4mL 0.05% 铁氰化钾溶液 (用 0.5mol/L Na₂CO₃ 配制), 100℃ 保温 10min。1000g 离心 10min, 还原糖的浓度采用 Imoto 法测定。一个酶活力单位定义为在以上反应条件下每分钟催化 1 μ mol 还原糖生成所需的酶量。

蛋白质的浓度采用紫外分光光度法, 浓度 (mg/mL) = 1.55A₂₈₀ - 0.75A₂₆₀。

1.8 电泳

SDS-PAGE 电泳按 Laemmli 法进行, 电泳胶浓度为 12%。

2 实验结果

2.1 烟曲霉几丁质酶 cDNA 的克隆

如图 1 所示, 比较其它真菌及其酵母菌的几丁

质酶氨基酸序列,发现其中包含有两个保守的区段,分别命名为 chimotif1 和 chimotif2。将构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)的几丁质酶 ChiB 的一段保守区段(105 - 151 位的氨基酸)在 TIGR 网站(The Institute for Genomic Research, <http://www.tigr.org/>)对烟曲霉基因组序列进行检索,发现 contig226、contig59、contig659、contig723 和 contig555 均包含有 chimotif1 和 chimotif2,氨基酸序列的同源性为 29% ~ 78%。进一步用烟曲霉几丁质酶的 N-端序列(ASCGYRVVY)进行检索^[23],仅检索到 contig555,氨基酸序列的同源性可以达到 100%。在 contig555 中包含一段 1.5kb 的序列,其中含有纯化蛋白的 N-端、chimotif1 和 chimotif2,同时这段序列和推测的几丁质酶基因序列的大小相一致。因此,可以推断这段序列为烟曲霉的几丁质酶的基因序列。根据这段序列设计了

几丁质酶基因的上游引物 5'-GCT AGC TCC GGT TAT CGC TCG GTC GTC GTC TAC-3'。

提取烟曲霉的总 RNA,以 poly(dT)₁₅-RA 作为引物反转录出 cDNA。以 cDNA 作为模板,以合成的上游引物及其 poly(dT)₁₅-RA 为引物可以扩增出一条 1.4kb 的片段。测序结果表明,这段序列含有 1248 个碱基对,其开放阅读框架起始于 GCT,终止于 TGA(图 2),编码 395 个氨基酸,N-端的氨基酸序列和纯化的几丁质酶的序列完全一致^[23],成熟蛋白的分子量为 43.6kD。因此我们将这个蛋白命名为 Chi44。这段序列在 Asn-225 存在一个潜在的 N-糖基化的位点。将 cDNA 序列和 contig555 比较可以看到这段基因包含有 6 个外显子/5 个内含子(图 3),推测基因全长 1299bp,始于 ATG,含有一段信号肽序列为 MR-FATSTIVKVALLLSSLCVDAAVMWNRDTSSTDLEAR。

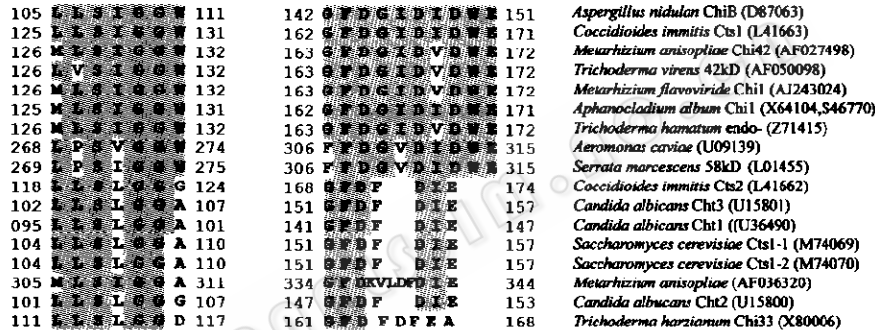


图 1 真菌与酵母几丁质酶的序列比对

Fig.1 Alignment of chitinases from fungi and yeasts

The multiple sequence alignment was calculated using Omiga (2.0) program

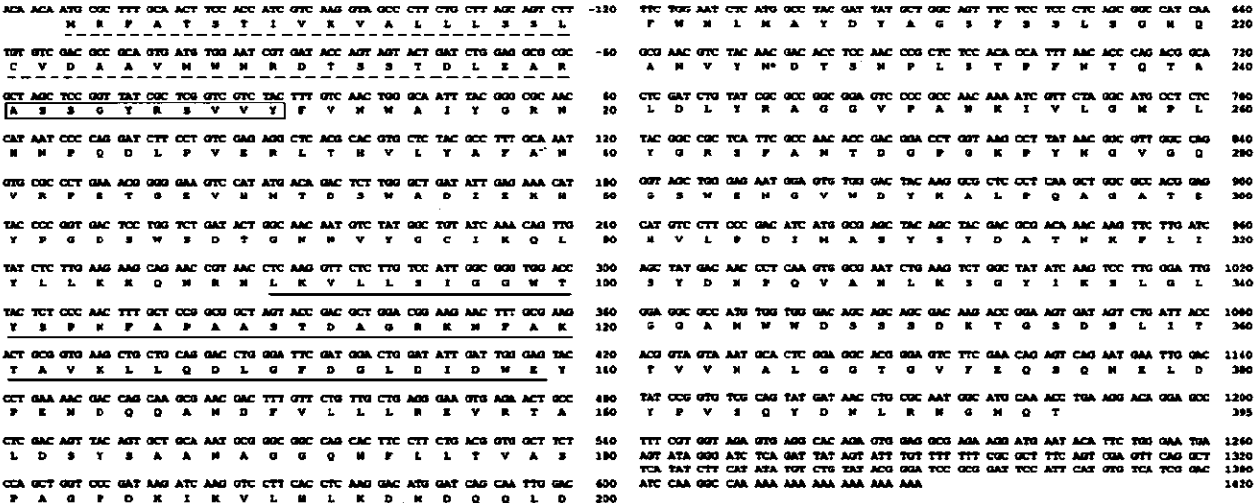
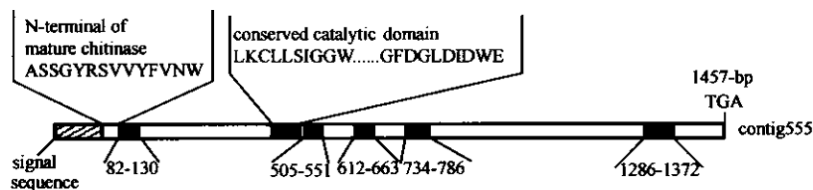


图 2 烟曲霉几丁质酶 Chi44 的全长 cDNA

Fig.2 The full-length cDNA encoding for *A. fumigatus* chitinase Chi44

The cDNA was isolated and sequenced as described under *Experimental Procedures*. The putative signal sequence is indicated by dashed line. N-terminal sequence determined using purified chitinase is boxed. The conserved catalytic domain is underlined. The Chi44 cDNA has been deposited in GenBank (Accession # AY271350)

图 3 烟曲霉几丁质酶基因 *chi44* 的结构Fig.3 The structure *A. fumigatus* chitinase gene *chi44*

The introns are indicated by black bars. The gray bar shows the conserved active site

在 GenBank 中检索,可以看到烟曲霉的几丁质酶和很多微生物来源的有很高的同源性,其同源性从 57% 到 65%,其中与 *Coccidioides immitis* (Accession number: AAB48567) 的几丁质酶的同源性最高。由于这些微生物来源的几丁质酶均属于 18 家族糖基水解酶,Chi44 与这些酶同源,而且具有 18 家族糖基水解酶所特有的保守氨基酸序列(chimotif1 和 chimotif2),因此 Chi44 也属于 18 家族的糖基水解酶。

2.2 重组几丁质酶在大肠杆菌及其酵母菌中的表达及纯化

按“材料与方法”中所述方法,将几丁质酶的 cDNA 分别转化到表达载体 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 和 *P. pastoris* GS115 中。

当在 *E. coli* 中表达时,大肠杆菌可以产生一个约 43kD 的重组蛋白(Chi44E)。以终浓度为 1mol/L 的 IPTG 诱导 2.5h,可从 1L 培养物的细胞裂解液中获得 368u 的 Chi44E,比活为 0.256u/mg。经硫酸铵沉淀、DEAE 离子交换层析和 Superdex-G75 纯化,酶的比活从 0.256u/mg 增加到 5.36u/mg,纯化了 20 倍(图 4 和表 1)。

酵母菌在甲醇的诱导下可以产生一个约 44kD 的重组蛋白(Chi44P)。在 400mL 以 BMMY 为培养基的细胞培养液中,每 24h 补加 1mL 甲醇诱导 72h,可获得 560u 的 Chi44P,其表达量是 *E. coli* 的 3.8 倍。

经硫酸铵沉淀,收集 30% ~ 60% 饱和度的蛋白,可以将上清液中的蛋白浓缩纯化,纯化后比活为 5.94u/mg(图 5)。

虽然 Chi44E 和 Chi44P 都有活性,但是大肠杆菌中的重组酶分子量相对酵母菌的分子量要小,这可能是由于大肠杆菌缺乏蛋白糖基化作用的结果。

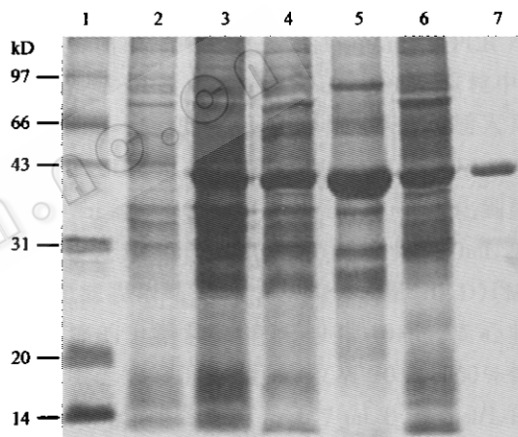


图 4 重组 Chi44 (Chi44E) 在大肠杆菌中的表达与纯化

Fig.4 Expression and purification of recombinant Chi44 (Chi44E) in *E. coli*

The analysis was carried out in 12% gel. 1: molecular marker; 2: cell lysate from *E. coli* BL21 harboring pET-15b; 3: cell lysate of *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET-chi; 4: supernatant of heat-treated extract; 5: the enzyme derived from ammonium sulfate fractionation; 6: the enzyme eluted from DEAE-cellulose chromatography; 7: chitinase obtained from superdexG-75

表 1 重组几丁质酶 (Chi44E) 的纯化

Table 1 Purification of recombinant chitinase (Chi44E) from *E. coli*

Purification step	Total protein /mg	Total activity /u	Specific activity /(u/mg)	Yield/%	Purification (fold)
Crude extract	1435.3	368	0.256	100	1.0
Heat precipitation	924.9	324	0.350	88	1.36
(NH ₄) ₂ SO ₄ (30% ~ 60% S)	436.3	298	0.683	80.9	2.66
DEAE-cellulose	57.3	215	3.75	58.4	14.6
SuperdexG-75	6.75	36.18	5.36	9.8	20.9

The purification of chitinase was carried out from the crude enzyme. One unit of chitinase activity was defined as the amount of enzyme that produces reducing sugar corresponding to 1 μ mol of N-acetylglucosamine per minute under the assay conditions.

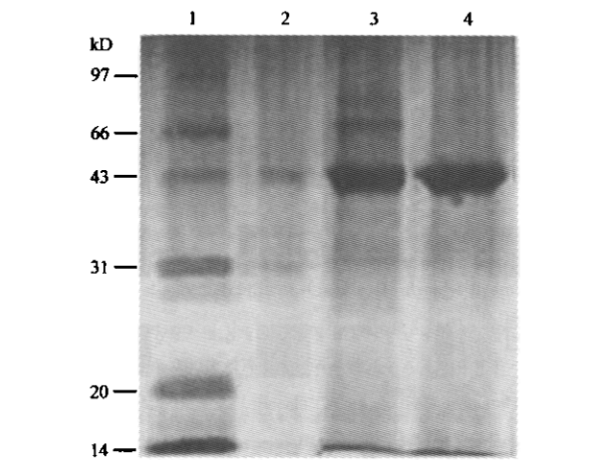


图5 重组几丁质酶在 *Pichia* GS115 中的表达

Fig.5 Expression of recombinant chitinase in *Pichia* GS115

1: molecular marker; 2: culture supernatant from *P. pastoris* transformed with pPIC9; 3: culture supernatant from *P. pastoris* transformed with pPIC-chi; 4: the enzyme derived from ammonium sulfate fractionation.

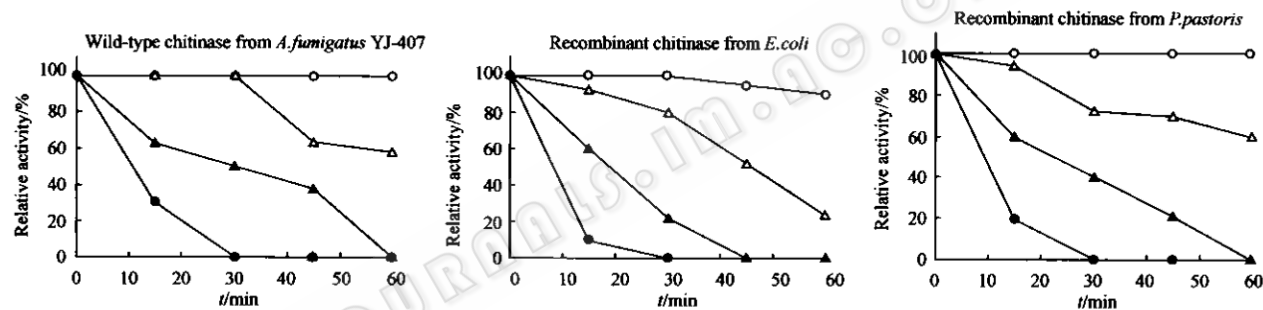


图6 野生型 Chi44 (A)、Chi44E (B)及 Chi44P (C)的热稳定性

Fig.6 Effect of temperature on the stabilities of wild-type Chi44 (A), Chi44E (B), and Chi44P (C)

The enzyme in 50 mmol/L sodium acetate buffer, pH 5.0 was separately incubated at 45°C (○), 55°C (△), 60°C (▲), and 65°C (●).

An aliquot of the enzyme solution was removed from each incubation mixture at different time intervals and assayed for the activity

3 讨论

目前的研究表明丝状真菌产生的几丁质酶在细胞壁的溶解、孢子萌发、菌丝生长、菌丝自溶、孢子分化、几丁质的同化和腐生生长中担负着重要的作用^[7,9,10]。因此由烟曲霉产生的几丁质酶很有可能作为抗烟曲霉感染药物开发的靶点,但迄今为止对烟曲霉所产生的几丁质酶的生理功能还不了解。我们曾报道了烟曲霉 YJ-407 的几丁质酶的纯化及其酶学性质。在本文中,我们的实验证据说明我们获得了烟曲霉几丁质酶 Chi44 的 cDNA 序列。首先,纯化的 Chi44 的 N-端序列和从 cDNA 翻译得到的蛋白质的 N-端序列吻合;其次,在大肠杆菌和酵母菌中

2.3 Chi44、Chi44E 和 Chi44P 热稳定性的比较

为比较在不同宿主中表达的酶的活性与稳定性的差异,我们测定了酶的最适温度及热稳定性。当在不同温度测定酶活性时,Chi44、Chi44E 和 Chi44P 的最适温度不存在差异,均为 60℃。

将野生酶及两种重组酶在不同的温度分别保温不同的时间,然后再测定酶活。结果表明,与 Chi44 相比较,Chi44E 的热稳定性有了显著的下降,而 Chi44P 的热稳定性只有轻微下降。Chi44E 在 45℃ 保温 1h 酶活力丧失 10%,60℃ 保温 30min 使酶活力丧失 78%;Chi44 和 Chi44P 在 45℃ 保温 1h 酶活不损失,Chi44P 在 60℃ 保温 30min 后,剩余酶活力只有 50%。虽然在 SDS-PAGE 凝胶上 Chi44P 与 Chi44 并未显示出分子量的差异,但它们的热稳定性却不同,提示它们的糖基化修饰的不同,而这些糖基化修饰可能对酶的热稳定性起重要作用。

表达的重组酶均可以检测到几丁质酶的活性。另外,我们还检测到大肠杆菌和酵母菌表达的重组酶均可以水解几丁六糖。

基于与其它来源的属于 18 家族糖苷水解酶类的几丁质酶序列的同源性,可将 Chi44 归属于 18 家族的糖苷水解酶。据报道,微生物来源的 18 家族几丁质酶都具有不同程度的转糖苷作用。在我们已经报道的研究结果中,以 PNP-几丁二糖作为底物检测到了几丁三糖中间产物的存在,说明 Chi44 除了有几丁质酶水解作用以外,它还具有转糖苷的作用^[23]。而作为 18 家族的糖苷水解酶,人几丁质酶 (HCHT)最近也被报道具有糖基转移作用^[24]。

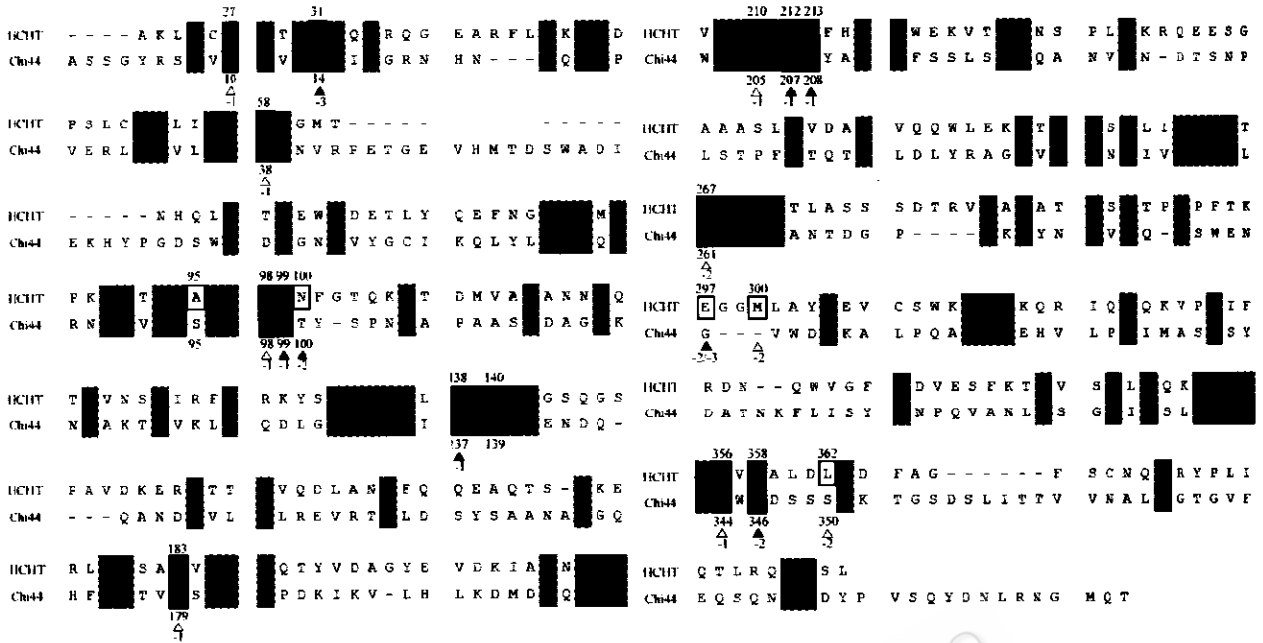


图7 烟曲霉几丁质酶(Chi44)与人几丁三糖酶(HCHT)的同源性比较

Fig.7 Alignment of *A. fumigatus* chitinase (Chi44) and human chitinotriosidase (HCHT)

The conserved amino acid residues are shaded. Triangles indicate residues that form hydrophobic (open) or hydrogen bonding (filled) interactions with allosamidin in HCHT-allosamidin complex. The subsite positions of allosamidin that residues interact with are numbered under triangles.

除了它独特的作用方式,耐热性好是 Chi44 的另一个显著的特性^[23]。当 Chi44 的 cDNA 转入大肠杆菌和酵母菌时,大肠杆菌中重组蛋白(Chi44E)比酵母菌中的重组蛋白(Chi44P)或者烟曲霉中的野生酶要小。分子量的差异是由于在不同的宿主细胞中的糖基化的不同所致。已有研究表明, *P. pastoris* 中表达的天冬氨酸蛋白酶上 N-糖链结构为 Man₆-₁₇ GlcNAc₂^[25]。根据我们的初步研究 *A. fumigatus* YJ-407 表达的野生酶 Chi44 是一个同时具有 N-糖链和 O-糖链的蛋白,其 N-糖链结构为 Man₆GlcNAc₂;但在 *P. pastoris* 中表达的 Chi44P 无 N-糖链,仅有 O-糖链,说明 *A. fumigatus* 与 *P. pastoris* 的糖基化修饰不同(结果另行发表)。而在 *E. coli* 中没有蛋白糖基化修饰系统,所以 Chi44E 是一个没有糖基化的蛋白。虽然两种形式的重组酶都有几丁质酶的活性,但 Chi44E 的热稳定性有很大的下降,而 Chi44P 的热稳定性有一定程度的下降。由于实验中所用的酶均为纯度相当的纯酶,可以排除因杂蛋白对酶的保护作用而导致的热稳定性差异。显然,重组酶与野生酶之间的稳定性差异只能归因于糖链修饰的不同。

尽管烟曲霉几丁质酶 Chi44 和人巨噬细胞的几

丁质酶 HCHT 在氨基酸序列上同源性并不高(27.9%),但二者催化降解几丁质的作用方式相似^[8,23-24]。HCHT 的晶体结构已解析,其与底物结合及催化活性相关的氨基酸残基已确定^[26-30]。在深入比较 Chi44 与 HCHT 氨基酸序列时我们注意到,Chi44 的催化活性区域(chimotif1 和 chimotif2)与底物结合位点的氨基酸残基与 HCHT 有很高的同源性^[27,28](图7),从而从结构基础上解释了两酶具有相似作用方式的原因。考虑到 HCHT 在人体中参与抵御含几丁质病原体的侵入,推测 Chi44 也有可能是烟曲霉分泌的一种可抑制其它真菌的酶,提示 Chi44 有可能直接用作抗真菌剂。尽管 Chi44 的性质已经被详细阐述^[23],但要真正将 Chi44 用作抗真菌感染药物,还需要对其结构功能、抗原性等进行深入的研究。另外,目前的研究结果还不能解释转糖基作用的机制,还需要进一步研究 Chi44 的结构,该方面的研究正在进行中。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Hawtin RE, Arnold K, Ayres MD et al. Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology*, 1995, 212: 673-685

- [2] Brurberg MB, Nes IF, Eijsink VGH. Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology*, 1996, **142**: 1581 - 1589
- [3] Kuranda MJ, Robbins PW. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1991, **266**: 19758 - 19767
- [4] Wu Y, Egerton G, Underwood AP *et al.* Expression and secretion of a larval-specific chitinase (family 18 glycosyl hydrolase) by the infective stages of the parasitic nematode, *Onchocerca volvulus*. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 42557 - 42564
- [5] Vinetz JM, Dave SK, Specht CA *et al.* The chitinase PfCHIT1 from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* lacks proenzyme and chitin-binding domains and displays unique substrate preferences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, **96**: 14061 - 14066
- [6] Sakuda S, Isogai A, Matsumoto S *et al.* Search for microbial insect growth regulators. II. Allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor. *J Antibiot (Tokyo)*, 1987, **40**: 296 - 300
- [7] Flach J, Pilet PE, Jolles P. What's new in chitinase research? *Experientia (Basel)*, 1992, **48**: 701 - 716
- [8] Renkema GH, Boot RG, Muijsers AO *et al.* Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 2198 - 2202
- [9] Gooday GW. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. *Biodegradation*, 1990, **1**: 177 - 190
- [10] Gooday GW. The ever-widening diversity of chitinase. *Carbohydrates in Europe*, 1997, **19**: 18 - 22
- [11] Izumida H, Imamura N, Sano H. A novel chitinase inhibitor from a marine bacterium, *Pseudomonas* sp. *J Antibiot (Tokyo)*, 1996, **49**: 76 - 80
- [12] Vinetz JM, Valenzuela JG, Specht CA *et al.* Chitinases of the avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*, a class of enzymes necessary for parasite invasion of the mosquito midgut. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 10331 - 10341
- [13] Sami L, Pusztahelyi T, Emri T *et al.* Autolysis and aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: Chitinase production and antifungal effect of allosamidin. *J Gen Appl Microbiol*, 2001, **47**: 201 - 211
- [14] Sakuda S, Isogai A, Matsumoto S *et al.* The structure of allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor, produced by *Streptomyces* sp. *Tetrahedron Lett*, 1986, **27**: 2475 - 2478
- [15] Kato T, Shizuri Y, Izumida H *et al.* Styloguanidines, new chitinase inhibitors from the marine sponge *Stylorella aurantium*. *Tetrahedron Lett*, 1995, **36**: 2133 - 2136
- [16] Boot RG, Blommaart EFC, Swart E *et al.* Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 6770 - 6778
- [17] Boot RG, Renkema GH, Verhoek M *et al.* The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 25680 - 25685
- [18] Hollak CEM, van Weely S, van Oers MHJ *et al.* Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest*, 1994, **93**: 1288 - 1292
- [19] Choi EH, Zimmerman PA, Foster CB *et al.* Genetic polymorphisms in molecules of innate immunity and susceptibility to infection with *Wuchereria bancrofti* in South India. *Genes Immun*, 2001, **2**: 248 - 253
- [20] Cohen J. Clinical manifestations and management of *Aspergillosis* in the compromised patient, in *Fungal Infection in the Compromised Patient* (Warnock, D. W., and Richardson, M. D., eds), pp. 118 - 152, John Wiley and Sons, Chichester, UK, 1991
- [21] Latgé J - P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, 1999, **12**: 310 - 350
- [22] Escott GM, Hearn VM, Adams DJ. Inducible chitinolytic system of *Aspergillus fumigatus*. *Microbiol*, 1998, **144**: 1575 - 1581
- [23] Xia G, Jin C, Zhou J *et al.* A novel chitinase having a unique mode of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407. *Eur J Biochem*, 2001, **268**: 4079 - 4085
- [24] Aguilera B, Ghauharali-van der Vlugt K, Helmond MTJ *et al.* Transglycosidase activity of chitotriosidase: improved enzymatic assay for the human macrophage chitinase. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 40911 - 40916
- [25] Montesino R, Nimtz M, Quintero O *et al.* Characterization of the oligosaccharides assembled on *Pichia pastoris*-expressed recombinant aspartic protease. *Glycobiology* 1999, **9**: 1037 - 1043
- [26] Fusetti F, van Moellre H, Houston D *et al.* Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 25537 - 25544
- [27] Ran FV, Houston DR, Boot RG *et al.* Crystal structures of allosamidin derivatives in complex with human macrophage chitinase. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 20110 - 20116
- [28] van Aalten DMF, Komander D, Synstad B *et al.* Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, **98**: 8979 - 8984
- [29] Terwisscha van Scheltinga AC, Armand S, Kalk KH *et al.* Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and X-ray structure of a complex with allosamidin: evidence for substrate assisted catalysis. *Biochemistry*, 1995, **34**: 15619 - 15623
- [30] Brameld KA, Goddard WA. Substrate distortion to a boat conformation at subsite - 1 is critical in the mechanism of family 18 chitinases. *J Am Chem Soc*, 1998, **120**: 3571 - 3580

Cloning and Expression of Chitinase Gene from *Aspergillus fumigatus* YJ-407

WANG Ying WANG Jun-Qi HU Hong-Yan YANG Xue-Peng YANG Shou-Jun YU Xiao-Ying JIN Cheng*

(State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Chi44 is an extracellular chitinase produced by *Aspergillus fumigatus* YJ-407. By blast-searching with the conserved amino acid sequences that were found in fungal chitinases and N-terminal sequence obtained from purified chitinase, contig555 was retrieved from unfinished *A. fumigatus* genome database. Based on the result of blast search, a 1.4-kb cDNA was isolated from *A. fumigatus* YJ-407 by reverse transcriptase-PCR. The open reading frame encodes a protein of 395 amino acids with a calculated molecular mass of 43.6kD. The predicted protein exhibited a high homology with the chitinases from other fungi at the amino acid sequence level. Also, the active site region was found to be highly homologous to human macrophage chitotriosidase. When the cDNA was expressed in *E. coli* and *Pichia pastoris* GS115, respectively, both 43kD protein induced in *E. coli* and 44kD protein induced in *Pichia* GS115 were active. However, these two recombinant proteins displayed decreases in stabilities, suggesting that the glycosylation played an important role in stabilization.

Key words *Aspergillus fumigatus*, chitinase, cDNA, expression, inhibitor, thermostability, allosamidin

Received: 03-31-2004

This work was supported by the Grants from Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-3-02-01), and the National Science and Technology Ministry, China (No. 2001CCA00100).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62587206; Fax: 86-10-62653468; E-mail: jin_c@sun.im.ac.cn

©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>