

里氏木霉纤维素酶基因表达与调控

邢翠霞, 夏雨潇, 张伟欣*, 刘巍峰*

山东大学 微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 266200

邢翠霞, 夏雨潇, 张伟欣, 刘巍峰. 里氏木霉纤维素酶基因表达与调控[J]. 微生物学通报, 2024, 51(12): 4884-4898.

XING Cuixia, XIA Yuxiao, ZHANG Weixin, LIU Weifeng. Progress in the cellulase gene expression and regulation in *Trichoderma reesei*[J]. Microbiology China, 2024, 51(12): 4884-4898.

摘要: 木质纤维素是可再生生物质资源的重要组成部分, 其高效生物降解可以为绿色生物制造提供重要的原料保障。里氏木霉(*Trichoderma reesei*)是主要的纤维素酶工业生产菌株, 其强大的纤维素酶生产能力对木质纤维素的水解糖化过程至关重要。在过去几十年中, 研究人员对里氏木霉纤维素酶的表达与调控机制有了比较深入的了解, 揭示了其酶系复杂的转录调控网络机制。本文系统综述了里氏木霉纤维素酶基因表达调控的关键环节, 包括信号传导、转录调控及染色质重塑等方面的相关研究进展, 并对如何通过遗传学改造提升里氏木霉纤维素酶的表达合成进行了总结和讨论。

关键词: 里氏木霉; 纤维素酶; 信号传导; 转录调控

Progress in the cellulase gene expression and regulation in *Trichoderma reesei*

XING Cuixia, XIA Yuxiao, ZHANG Weixin*, LIU Weifeng*

State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266200, Shandong, China

Abstract: As an abundant and renewable bioresource, lignocellulose after efficient depolymerization can provide raw materials for green bio-manufacturing. *Trichoderma reesei* is one of the main industrial producers of cellulases. Its outstanding capability of producing cellulases plays an important role in lignocellulose saccharification. In the past few decades,

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0900500); 国家自然科学基金(31670040, 31470162); 山东省自然科学基金重大基础研究项目(ZR2019ZD19)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0900500), the National Natural Science Foundation of China (31670040, 31470162), and the Major Basic Research Project of Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2019ZD19).

*Corresponding authors. E-mail: LIU Weifeng, weifliu@sdu.edu.cn; ZHANG Weixin, zhangwx@sdu.edu.cn

Received: 2024-06-27; Accepted: 2024-09-21; Published online: 2024-10-15

researchers have gained a preliminary understanding of the mechanisms underlying the induced cellulase gene expression in *T. reesei*, and revealed a complex regulatory network controlling the biosynthesis of various glycohydrolytic enzymes. Here we systematically review the recent progress in the regulation of cellulase gene expression in *T. reesei* regarding signal transduction, transcriptional regulation, and chromatin remodeling. Furthermore, we review the latest progress in genetic engineering for improving cellulase production based on the understanding of the above regulatory network.

Keywords: *Trichoderma reesei*; cellulase; signal transduction; transcriptional regulation

随着全球经济的快速发展以及对化石燃料消耗的日益增加,以木质纤维素为代表的可再生生物质被认为是潜在的重要替代资源,其纤维素和半纤维素组分可被进一步用于发酵生产包括生物燃料乙醇和大宗生物基化学品的葡萄糖和木糖等碳水化合物,对发展基于绿色生物制造的可循环经济具有极为重要的现实意义^[1-2]。

自然界存在许多可有效降解利用木质纤维素的微生物,一方面它们对木质纤维素的降解是地球碳循环的重要组成部分,另一方面来自这些微生物的高效水解酶系是实现木质纤维素转化利用的前提^[3]。丝状真菌里氏木霉(*Trichoderma reesei*)是降解纤维素的代表性菌株,它属于子囊菌门(*Ascomycota*)粪壳菌纲(*Sordariomycetes*)肉座菌目(*Hypocreales*)肉座菌科(*Hypocreaceae*)的木霉属(*Trichoderma*)菌株,其胞外最高纤维素酶产量高达 100 g/L^[4-5]。里氏木霉分泌的纤维素酶属于全值酶系,主要包括:(1) 外切葡聚糖酶,又称为 1,4- β -D-葡聚糖-纤维二糖水解酶(cellobiohydrolase 或 $\text{exo-}\beta$ -(1,4)-D-glucanase, EC 3.2.1.91, CBH); (2) 内切葡聚糖酶(endo-1,4- β -D-glucanases, EC 3.2.1.4, EG); (3) β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase 或 β -D-glucosideglucohydrolases, EC 3.2.1.21, BG)^[6-7]。里氏木霉纤维素酶的诱导合成受到严谨控制,当存在易利用碳源(葡萄糖)时,纤维素酶基因的转录被阻遏;只有当葡萄糖耗尽且木质纤维素类底物存在时,里氏木霉

才可快速开启纤维素酶基因的高水平表达^[8-10]。因此,里氏木霉纤维素酶诱导表达过程中的一个重要科学问题就是其如何感知外界碳源的变化并迅速启动纤维素酶基因的表达。目前众多调控里氏木霉纤维素酶基因诱导表达的转录因子得以鉴定,且相关营养信号感应及染色质结构水平的调控过程也开始逐渐被揭示,这些研究将不仅有助于深化人们对以里氏木霉为代表的纤维素降解微生物的生理生态适应机制的认识,也将为通过遗传改造提升其(半)纤维素酶生产水平,从而降低木质纤维素生物炼制与绿色生物制造的成本奠定基础。本文对近 10 年里氏木霉纤维素酶基因转录表达调控以及通过遗传学改造提升其纤维素酶合成水平的相关研究进展进行综述和讨论。

1 里氏木霉纤维素酶诱导表达中的信号感应及传导

里氏木霉作为纤维素酶高产菌,其纤维素酶诱导表达模式与大肠杆菌的乳糖操纵子及酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的半乳糖代谢基因表达有相似之处^[11]。但与上述 2 种替代碳源诱导物分子可以直接参与调控相应代谢基因的表达不同,木质纤维素作为水不溶性聚合物难以进入细胞。因此,关于里氏木霉纤维素酶诱导合成模式的一个观点是其即使在阻遏条件下也会低水平表达特定纤维素酶,并由此水

解纤维素底物以产生少量寡糖信号分子, 被细胞膜受体直接感应, 或被转运入菌体细胞后启动相应信号传递途径并最终促成纤维素酶基因的表达^[6]。除可溶性诱导信号假设外, 里氏木霉菌体可能直接感应不溶性纤维素分子。到目前为止, 介导纤维素酶基因表达的诱导信号本质及其相应的感应受体或转运蛋白仍不十分明确。近年来许多有关糖转运蛋白、G 蛋白偶联受体及胞内相关信号传递组分在里氏木霉纤维素酶诱导表达中的作用得以报道, 为我们全面理解其纤维素酶的诱导合成机制提供了有效信息。

1.1 里氏木霉糖转运蛋白受体与纤维素酶诱导

真核生物细胞膜蛋白被认为在感知外界环境条件变化的过程中发挥着重要的作用, 其中包括糖转运蛋白在内的各种转运蛋白可通过识别或介导胞外可溶性底物转运进入细胞来传递诱导信号, 而真菌中大部分糖转运蛋白均属于主要易化子超家族(major facilitator superfamily, MFS)成员。Zhang 等^[12]在里氏木霉中鉴定了一个具有乳糖和纤维二糖转运活性的 MFS 家族糖转运蛋白 Crt1, 其缺失可以完全消除纤维素酶在纤维素或乳糖条件下的诱导表达, 但并不影响木聚糖酶的诱导表达。研究进一步发现, Crt1 调节纤维素酶诱导表达的功能与其纤维二糖或乳糖转运活性无关, 并且其胞内羧基端区域的存在对纤维素酶诱导表达至关重要, 但羧基端区域参与木质纤维素信号传导的途径机制还不清楚, 仍须深入解析^[13]。Crt1 的上述特性也与粗糙脉孢霉(*Neurospora crassa*)中 2 个 MFS 家族纤维寡糖转运蛋白 CDT-1 与 CDT-2 相一致, 它们也呈现转运活性非依赖的介导纤维素酶诱导表达的功能^[14]。最近研究还发现里氏木霉中另一个糖转运蛋白 Crt2 也能够参与调控纤维素酶

的诱导表达, 且其过表达可部分回补 Crt1 缺失造成的纤维素酶诱导合成缺陷^[15]。此外, 纤维二糖转运蛋白 Tr69957 与葡萄糖转运蛋白 Stp1 均被报道可影响纤维素酶的诱导表达^[16]。

1.2 G 蛋白偶联受体信号感应传导与纤维素酶诱导合成

G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)是真核生物中普遍存在的一类营养物质信号感受器, 其识别配体(ligand)后会促进偶联的 G 蛋白 α 亚基所结合的 GDP 交换为 GTP, 从而使得 G 蛋白解离为 $G\alpha$ 和 $G\beta\gamma$ 二聚体^[17-18]。游离的 $G\alpha$ 和 $G\beta\gamma$ 分别可调节腺苷酸环化酶以及丝裂原活化蛋白激酶等级联组分的活性进而调控众多细胞过程^[19]。

目前, 纤维素降解丝状真菌中是否存在特异性响应木质纤维素信号的 GPCR 仍尚未明确。对同样表达纤维素酶的丝状真菌粗糙脉孢霉的转录组分析发现, 多数 GPCR 在纤维素诱导条件下呈显著差异性表达, 并且有 3 个 GPCR 的缺失突变体在纤维素下的生长较野生型更好^[20], 从而暗示 GPCR 在丝状真菌木质纤维素信号感知中可能发挥重要作用。里氏木霉基因组注释发现存在 58 个 GPCR, 根据遗传相关性可将它们划分为 14 个家族(I-XIII 型和 PTH11 型受体)^[21-22]。近期研究发现, XIII 型 GPCR Csg1 的缺失基本消除了其胞外纤维素酶的合成分泌, 从而影响了里氏木霉在纤维素底物上的生长; 进一步分析发现 $\Delta csg1$ 菌株仅在诱导早期影响纤维素酶基因的诱导转录, 但其后期转录水平与野生型无显著差异^[23]。因此, 推测 Csg1 更大可能是在纤维素酶基因的转录后层面影响了纤维素酶的表达分泌, 其具体作用机制还有待深入解析。由于 GPCR 数量众多且相互之间可能存在功能冗余, 给其功能表征带来较大困难, 将来可从与其偶联的 G 蛋白及其下游信号

途径组分入手研究其在里氏木霉纤维素信号的感应传导过程。

作为 GPCR 的直接效应因子, 里氏木霉的 Gna1、Gna2 和 Gna3 这 3 个 G α 蛋白在纤维素酶基因诱导中也发挥着不同作用。研究表明, Gna1 的缺失导致黑暗条件下纤维素酶基因的诱导转录水平上调 10 倍, 但会完全消除其在光照条件下的诱导转录; 与其缺失表型相对应, Gna1 的组成型激活突变体虽并不影响黑暗条件下纤维素酶基因的转录, 但可使其在光照条件下的诱导转录提升 5 倍^[24]。Gna3 同样具有光依赖的纤维素酶诱导调控效应, 敲低 *gna3* 可显著抑制光照条件下 *cbh1* 的诱导转录, 而表达 Gna3 的组成型激活突变体则可将 *cbh1* 的转录水平提升 10 倍以上, 但与 Gna1 不同, Gna3 并不影响黑暗条件下的纤维素酶诱导表达; 进一步分析表明 Gna3 在光照条件下对纤维素酶基因的诱导转录提升被认为与胞内环腺苷单磷酸 (cAMP) 水平正相关^[25-26]。Gna1 和 Gna3 组成型激活突变体均无法实现里氏木霉在阻遏碳源下纤维素酶的组成型表达, 表明二者并非纤维素诱导信号的必需传导组分。

G 蛋白的另外 2 个亚基 G β 与 G γ 除了调节 G α 的 GTP 水解活性外, 也参与丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 活性的调控。里氏木霉基因组中分别只有一个 G β (*Gnb1*) 和 G γ (*Gng1*) 编码基因。与粗糙脉孢霉中 G β 或 G γ 缺失导致胞外纤维素酶的消除不同^[26], 里氏木霉 *Gnb1* 与 *Gng1* 的缺失并不影响其胞外纤维素酶水解活性^[27], 从而暗示了不同纤维素降解真菌中的差异化调控模式。

1.3 胞内信号传导组分与纤维素酶诱导合成

里氏木霉存在 3 种 MAPK, 其中 Hog1 同源蛋白 Tmk3 被认为可能通过影响转录因子的磷酸化水平而参与纤维素诱导信号的传导, 其

缺失导致里氏木霉纤维素酶基因的转录和蛋白分泌严重受损^[28]。研究还发现 Tmk3 上游信号传导组分 MAPKKK——Sho1 和 Sln1 也参与了纤维素酶的诱导调控^[29]。与 Tmk3 不同, 里氏木霉中另外 2 个 MAPK 同源蛋白的缺失则均导致纤维素酶表达分泌水平的提高, 但这一提升并非源于纤维素酶基因的转录上调, 而可能是由于菌丝体生长的改善及细胞壁完整性改变所致^[30]。

一些 Ras 家族小 GTP 酶同样可能作为途径下游效应因子来传导纤维素诱导信号。里氏木霉中 Ras GTP 酶基因 *ras2* 的缺失突变体胞外切酶活性大幅降低, 而这种降低被认为是纤维素酶基因关键转录激活因子 Xyr1 的转录水平降低所导致, 因为组成型表达 Xyr1 可部分回补上述缺陷表型^[31]。进一步分析表明, TrRas2 并非通过 cAMP-蛋白激酶 A (PKA) 途径影响 *xyr1* 的转录表达, 其具体的调控机制仍须解析。与 TrRas2 不同, 另一种 Ras GTP 酶 *rsr1* 基因敲除后胞外各类纤维素酶的酶活可提升 1 倍以上, 其主要通过调控 cAMP-PKA 途径抑制 Xyr1 和 Ace3 基因的转录, 进而抑制纤维素酶的诱导表达^[32]。

cAMP 被认为是真核生物细胞代谢调控的重要信使分子, 上述 Gna1、Gna3 以及 Rsr1 均可通过影响胞内 cAMP 水平来介导对纤维素酶基因诱导表达的调控。Schuster 等^[33]发现里氏木霉中介导 cAMP 合成的腺苷酸环化酶 *Acy1* 缺失后, 不论黑暗或光照条件下外切纤维素酶基因的转录水平均会降低, 这与粗糙脉孢霉中腺苷酸环化酶 CR-1 促进纤维素酶基因诱导表达的结果类似^[26]。Nogueira 等^[34]则进一步发现添加 1 mmol/L dbcAMP 可以改善里氏木霉 Δ *acy1* 菌株纤维素酶的诱导表达分泌; 与 *Acy1* 缺失表型不同, 作为 cAMP 的感受器和效应因子, 里氏木霉 PKA 催化亚基 *Pkac1* 在光照条件下通过调节主要转录因子 Xyr1 基因的转录水

平以促进纤维素酶的诱导表达, 但其在黑暗条件下则表现出对纤维素酶诱导表达的抑制, 从而暗示 cAMP 及其效应因子组分在纤维素酶诱导表达过程中可能针对各种环境条件变化而发挥不同的调控作用。

2 里氏木霉纤维素酶基因的转录调控网络与机制

里氏木霉纤维素酶的合成表达受控于一个复杂而严谨的转录调控网络, 菌体将感应到的外界信号通过胞内级联传导最终作用于特定的转录因子, 从而激活或者抑制相关酶基因的转录表达。近 20 年的研究中, Xyr1、Ace2、Ace3 等正调控因子, 以及 Cre1、Ace1 和 Rce1 等负

调控因子被分离鉴定, 其相关作用机制, 尤其是关键转录激活因子 Xyr1 的转录激活机制也逐渐被揭示(图 1)。

2.1 纤维素酶基因表达的关键转录激活因子: Xyr1

在众多参与调控里氏木霉纤维素酶基因的转录因子中, 木聚糖酶调控因子 1 (xylanase regulator 1, Xyr1) 是几乎所有纤维素酶和半纤维素酶基因的关键转录激活因子^[35]。组成型表达 Xyr1 可以解除里氏木霉的碳分解代谢物阻遏效应(carbon catabolite repression, CCR), 实现纤维素酶在葡萄糖等阻遏碳源下的高水平表达^[36-37]。Xyr1 含有一个真菌特有的 Zn(II)₂Cys₆ 型 DNA 结合结构域(DNA-binding domain, DBD), 该结构域

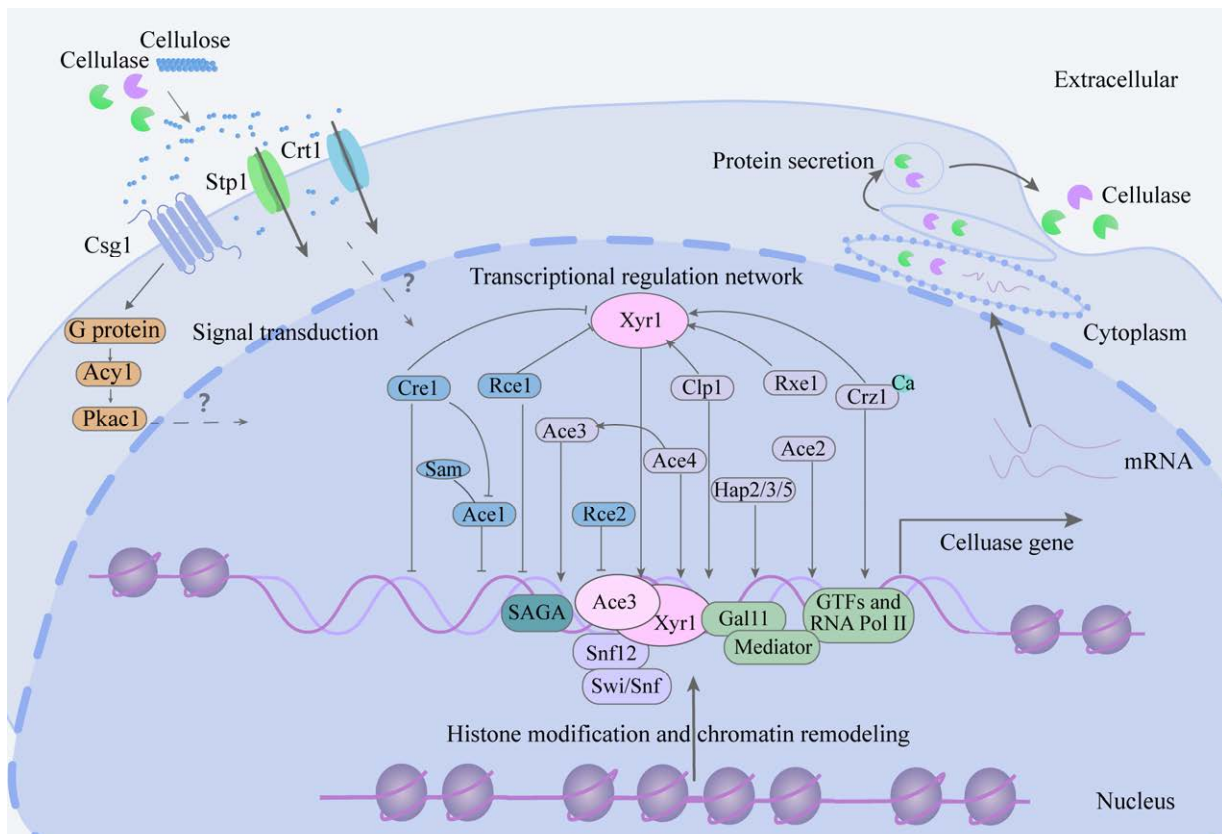


图 1 里氏木霉纤维素酶基因表达与调控示意图

Figure 1 Schematic diagram of cellulase gene expression and regulation in *Trichoderma reesei*.

可直接与靶基因启动子区域中的 5'-GGC(T/A)₄-3' 回文基序结合；除了 N 端 DBD, Xyr1 还包括 C 端转录激活结构域(activation domain, AD)和中间同源区段(middle homologous region, MHR); Xyr1 AD 被认为可介导招募包括 RNA 聚合酶在内的转录机器,但目前对 MHR 区段的功能仍缺乏认知^[38-39]。研究表明,将 Xyr1 AD 中的 821 位的缬氨酸突变为苯丙氨酸、824 位丙氨酸突变为缬氨酸、434 位精氨酸突变为亮氨酸或 873 位丙氨酸突变为酪氨酸,并对相应突变体 Xyr1 进行组成型表达,均能显著提高里氏木霉在葡萄糖条件下的木聚糖酶表达水平^[35,38,40-41],暗示 Xyr1 在纤维素酶和木聚糖酶基因的转录激活中发挥的作用模式不尽相同。此外, Xyr1 羧基末端区域(861-940 位氨基酸)可以介导 Xyr1 的自二聚体化,该区域缺失会导致纤维素酶诱导表达的完全消除,而木聚糖酶诱导表达几乎不受影响^[42]。本课题组近期研究表明, Xyr1 的 AD 结构域可与转录机器装置中的中介体复合物亚基 Gal11 (Med15)直接相互作用,从而介导促进 RNA 聚合酶 II 的招募来起始纤维素酶基因的诱导转录^[43]。同时, Xyr1 还可募集染色质重塑复合物 SWI/SNF 以及辅激活因子复合物 Cyc8/Tup1 到纤维素酶基因启动子上,从而协助激活纤维素酶基因的转录^[44-45]。

2.2 纤维素酶基因转录激活因子: Ace2 和 Ace3

Ace2 可特异性识别纤维素酶基因 *cbh1* 启动子中的 5'-GGSTAATA-3' 序列,此序列元件也存在于 *cbh2* 和 *xyn2* 启动子中;敲除 *ace2* 会导致主要纤维素酶和木聚糖酶基因转录延迟,并且诱导后期纤维素酶与木聚糖酶酶活比野生型降低 30%-70%,而过表达 *ace2* 可增强里氏木霉纤维素酶和半纤维素酶基因的表达^[46]。此外,研究还发现 Ace2 存在磷酸化修饰,且此种

修饰及其自身二聚体化是 Ace2 与靶基因启动子结合的前提条件^[47]。

Häkkinen 等^[48]利用里氏木霉基因组中真菌 Cys6 锌指型转录因子编码基因呈现与(半)纤维素酶编码基因成簇分布的这一特点,发现了一个新的纤维素酶基因表达必需转录因子——Ace3。Ace3 的缺失不仅会显著下调大部分纤维素酶、半纤维素酶和相关转录因子基因的转录,而且还会抑制乳糖代谢相关基因的表达;进一步分析发现, Ace3 可特异性结合 5'-CGGAN(T/A)₃-3' 序列元件,并且 Ace3 (523-734 位氨基酸)与 Xyr1 (771-865 位氨基酸)之间存在相互作用,形成的异二聚体可与靶基因启动子结合,从而协同调控纤维素酶或半纤维素酶基因的表达^[48]。此外, Ace3 还可以结合到糖转运蛋白受体 Crt1 基因启动子上,发挥正向促进其转录的调控作用^[42]。

2.3 负调控纤维素酶基因表达的碳代谢阻遏抑制因子: Cre1

里氏木霉纤维素酶的表达受碳分解代谢物阻遏效应的严谨调控,即当环境中存在葡萄糖时,纤维素酶基因的转录受到抑制,而当葡萄糖耗尽且存在纤维素来源诱导物时,纤维素酶基因可得以迅速大量表达,从而确保菌体以最经济的方式来实现对环境条件变化的适应。Cre1 是 CCR 途径的重要调控因子,可通过与靶基因启动子区域中的 5'-SYGGRG-3' 基序结合抑制纤维素酶和木聚糖酶编码基因的表达^[49]。因此,对纤维素酶基因启动子中相关 Cre1 结合位点进行突变,可解除里氏木霉纤维素酶基因在葡萄糖条件下受到的 CCR 效应^[50]。另外, *cbh2* 启动子在 -222 bp 同样含有一个 Cre1 结合位点,但相关研究表明 Cre1 并不直接参与 *cbh2* 转录的调节,而是通过参与该启动子区域的核小体排布间接影响 *cbh2* 的诱导表达^[51]。比较基因组序列分析显示纤维素酶高产菌株 Rut-C30

中, Cre1 仅保留了其 N 端 96 个氨基酸, 但此截短形式的 Cre1 对 Rut-C30 的纤维素酶基因表达至关重要, 对其进行进一步缺失则会导致纤维素酶诱导表达的消除^[52]。与此结果对应, 对野生型菌株 QM6a 中的 Cre1 进行相应截短后, 纤维素酶和半纤维素酶在葡萄糖条件下就可以低水平表达, 并且在纤维素诱导条件下可分别提升 20 倍和 10 倍^[53]。

与 Cre1 在酿酒酵母中的同源物 Mig1p 通过募集辅阻遏复合物 Tup1p-Cyc8p (Ssn6) 发挥抑制作用不同, 里氏木霉中 Tup1p 和 Cyc8p 同源蛋白编码基因的敲低并不能实现 CCR 的解除, 相反会严重损害纤维素酶的表达; 进一步分析表明, 里氏木霉 Tup1-Cyc8 复合物与 Xyr1 间以相互依赖的方式促进各自对纤维素酶基因启动子的结合, 从而发挥辅激活因子功能, 促进纤维素酶基因的诱导表达^[45]。上述结果说明里氏木霉与酿酒酵母中由 Cre1/Mig1p 介导的 CCR 机制在一定程度上存在很大差异。

2.4 其他纤维素酶基因转录调控因子

Ace1 是除 Cre1 外早期发现的另一个纤维素酶基因转录抑制因子。最近研究发现, Ace1 的第 383 位精氨酸是潜在的甲基化修饰位点, 甲基转移酶 TrSam 通过对该位点的甲基化修饰可以提高 Ace1 与 DNA 结合的能力, 进而间接调控纤维素酶基因的转录表达; 将该精氨酸位点突变为谷氨酰胺(R383Q)后, Ace1 的 DNA 结合能力以及其与转录激活因子 Xyr1 的竞争能力下降, 从而可导致碳代谢阻遏的部分解除^[54]。

Chen 等^[55]通过比较基因组分析在里氏木霉中鉴定到一个可与 2 个邻近的 5'-GGCC-3' 基序结合的转录激活因子 Ace4, Ace4 不仅直接与纤维素酶基因启动子结合, 还可与 ace3 启动子结合, 从而促进纤维素酶基因的诱导表达。本课题组前期通过酵母单杂交发现 2 个可分别

与 *xyr1* 及 *cbh1* 启动子结合的转录因子 Rxe1 和 Rce1^[56-57]。里氏木霉中敲低 *rxel* 会导致 *xyr1* 和各纤维素酶基因表达水平的下降, 而过表达 *xry1* 可以挽救这一缺陷^[56]; 与 Rxe1 不同, *rce1* 敲除则可增强纤维素诱导条件下主要纤维素酶基因的表达, 但不影响木聚糖酶基因在木聚糖诱导下的表达。进一步分析表明, Rce1 主要通过拮抗转录激活因子 Xyr1 对 *cbh1* 启动子的结合来发挥转录抑制作用^[57]。课题组还在里氏木霉中鉴定到一种植物同源域(PHD)家族的调控因子 Clp1, 其在纤维素诱导条件下被招募到纤维素酶基因启动子上, 并参与纤维素酶基因的激活过程; 该蛋白缺失可导致 Xyr1 在纤维素酶基因启动子上的结合效率明显下降, 进而影响纤维素酶基因的诱导表达^[58]。此外, 研究人员还在导入了人工锌指蛋白转录因子(artificial zinc finger protein, AZFP)文库的工程菌株中, 通过转录分析鉴定到一个含有 Zn(II)₂Cys₆ 双核簇类 DNA 结合结构域的转录抑制因子 Ctf1^[59]。研究显示, Ctf1 缺失可能通过上调转录因子 *vib1* 并抑制 *rce1* 的转录表达, 进而促进 Ace3 和 Xyr1 表达, 最终导致纤维素酶表达水平提升^[59]。上述结果均说明参与里氏木霉纤维素酶基因诱导表达调控的转录因子不仅可以通过直接与靶基因直接作用而发挥调控作用, 它们相互之间也存在协同调控关系, 从而形成一个严谨、精准的转录调控网络。

Ca²⁺作为第二信使调节生物体的生长, 并在生物体快速感知外界环境条件变化进而响应外界胁迫过程中发挥重要作用^[60]。Crz1 是一种钙调磷酸酶应答的锌指转录调控因子, 里氏木霉 Crz1 可以直接与转录激活因子基因 *xyr1* 和纤维素酶基因 *cbh1* 的上游区域结合, 其缺失显著抑制了 *xyr1* 的转录及纤维素酶的表达分泌^[61]。Zn²⁺也是许多转录因子和酶的调节辅因子^[62],

研究发现,在低浓度 Zn^{2+} (1–4 mmol/L)刺激下,里氏木霉的主要纤维素酶和木聚糖酶基因表达水平可显著增加^[63]。转录组分析发现里氏木霉中一个响应锌离子的转录因子 ZafA 缺失会显著降低或完全抑制 Zn^{2+} 诱导的纤维素酶表达;在 Zn^{2+} 存在的情况下,ZafA 增强了转录激活因子基因 *xyr1*、*ace3* 及 *vib1* 的转录^[64]。

3 染色质修饰重塑与纤维素酶基因表达

染色质结构的动态变化是真核生物基因表达调控的一个重要环节,近些年研究发现其修饰或重塑也在里氏木霉纤维素酶基因的诱导表达过程中发挥着非常重要的调控作用。早期研究发现,里氏木霉 *cbh1* 启动子和部分编码区在葡萄糖抑制条件下均可被多个核小体所占据,而诱导物槐糖对纤维素酶基因的诱导表达可导致编码区核小体的丢失以及启动子区核小体的重排,由此阻止 Cre1 对相应启动子位点的结合;进一步研究发现,Cre1 截短突变或缺失会引发葡萄糖抑制条件下 *cbh1* 编码区核小体的丢失^[51]。本课题组研究也表明,里氏木霉组蛋白乙酰基转移酶复合物 Spt-Ada-Gcn5 acetyl transferase (SAGA)催化亚基 Gcn5 的缺失可导致 *cbh1* 启动子区组蛋白 H3 第9和14位的赖氨酸乙酰化修饰程度明显降低,并严重影响了纤维素酶基因的诱导表达^[64]。此外,里氏木霉中一个潜在的组蛋白甲基转移酶 Lae1 也对纤维素酶的诱导表达极为重要。*lae1* 基因缺失会消除所有纤维素酶及降解辅助因子、 β -葡萄糖苷酶和木聚糖酶的表达,而过表达 *lae1* 则会显著提升纤维素基因的转录;但进一步的染色质免疫沉淀分析显示,Lae1 可能并不直接参与基因转录密切相关的组蛋白 H3、K4 或 K9 的甲基化修饰,其是否存在

其他修饰靶点还须进一步明确^[65]。

除染色质组蛋白修饰外,通过染色质重塑来改变核小体位置或组成,并由此引发基因表达水平的变化也是真核生物基因表达调控的一个重要方面。本课题组近期研究表明,Xyr1 可通过与 Snf12 亚基相互作用来招募染色质重塑复合物 SWI/SNF,从而改变纤维素酶基因启动子区的核小体占据状态以促进其表达^[44]。缺失 Snf12 或 SWI/SNF 复合物其他亚基会干扰纤维素酶诱导后 *cbh1* 和 *egl* 启动子区组蛋白 H4 的丢失;进一步研究发现,另一个染色质重塑复合物催化亚基 Isw1 在协调里氏木霉纤维素酶和次级代谢产物——黄色色素的生物合成过程中发挥着重要的双重调控作用^[66]。Isw1 一方面通过促进纤维素酶基因启动子区的核小体丢失而协助 Xyr1 介导的纤维素酶基因的转录激活,另一方面通过维持黄色色素基因簇(*sor*)启动子区的核小体占据和抑制转录激活因子 Ypr1 的表达,实现对黄色色素合成的控制^[66]。

4 转录调控因子遗传改造在提升里氏木霉纤维素酶表达合成中的应用

里氏木霉野生型菌株 QM6a 自二战期间被分离获得后,人们便开始对其进行了长期的诱变驯化以大幅度提升其纤维素酶生产能力^[67-68]。随着对其转录调控网络机制的深入了解,人们也开始结合利用遗传改造策略,有针对性地通过点突变、转录抑制因子敲除或者转录激活因子过表达来定向改造菌株,以提升其酶基因转录水平,从而获得能更高产纤维素酶系的菌株(表1)。研究表明,在里氏木霉中敲除 *ace1* 并在该基因座位插入以 *cbh1* 启动子表达 β -葡萄糖苷酶基因 *bgl1* 或内切葡聚糖酶基因 *egl1* 的表达

表 1 里氏木霉中基于转录调控因子提升纤维素酶表达的遗传改造策略

Table 1 Summary of genetic engineering strategies based on transcriptional factors regulating cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*

策略		结果	参考文献
Strategy		Result	Reference
敲除转录抑制因子	Ace1	纤维素酶活提高	[69-70]
Delete		Increase in cellulase activity	
transcriptional repressor	Cre1	滤纸酶活提升 72.6%	[71]
	Rce1	72.6% increase in filter paper enzyme activity	
过表达转录激活因子	Xyr1	内切酶与外切酶酶活提升 70%	[57]
Overexpressing		70% increase in endonuclease and exonuclease enzyme activity	
transcriptional activator	Xyr1	解除 CCR, 联合 <i>bgl1</i> 过表达将滤纸酶活提高 102%, 糖化效率提高 85%	[37,72]
	Ace2	Eliminate CCR and its combination with <i>bgl1</i> overexpression lead to an 102% increase in filter paper enzyme activity and 85% increase in saccharification efficiency	
	Ace3	滤纸酶活提高 2 倍	[46]
构建转录激活因子的活性突变体	Xyr1: A824V	2 folds increase in filter paper enzyme activity	
Constructing active mutants of	Xyr1: V821F	纤维素酶基因转录水平提高 6.4 倍	[73]
transcriptional activators	Xyr1: R434L	6.4 folds increase in transcription level of cellulase genes	
	Xyr1: A873Y	木聚糖酶基因与纤维素酶基因转录水平显著提高	[40]
	Cre1: S388V	Significant increase in xylanase gene and cellulase gene transcript levels	
	Xyr1: A873Y	木聚糖酶酶活显著提升	[35]
	Xyr1: A873Y	Significant increase in xylanase enzyme activity	
	Xyr1: A873Y	外切酶酶活提升 80%, 糖化效率提升 21%	[38]
	Xyr1: A873Y	80% increase in exonuclease activity and 21% increase in glycation efficiency	
	Xyr1: A873Y	纤维素酶产量升高 3.3 倍	[41]
	Xyr1: A873Y	3.3 folds increase in cellulase production	
	Cre1: S388V	葡萄糖条件下滤纸酶活和外切酶酶活分别提升 2.25 倍和 2.45 倍	[74]
	Cre1: S388V	Under glucose conditions, 2.25 folds increase in filter paper enzyme activity and 2.45 folds increase in exonuclease enzyme activity	
构建人工转录因子	人工锌指蛋白文库	突变株 U3 滤纸酶活提升 55%, β -葡萄糖苷酶酶活提升 8.1 倍	[75]
Constructing artificial transcription factor	Artificial zinc finger protein library	In mutant strain U3: 55% increase in filter paper enzyme activity and 8.1 folds increase in β -glucosidase enzyme activity	
	DBD _{ace1} -ADVP16	滤纸酶活提升 80%	[76]
	DBD _{ace2} -ADVP16	80% increase in filter paper enzyme activity	
	DBD _{ace2} -ADVP16	滤纸酶活提升 1.3 倍	[77]
	DBD _{cre1} -ADVP16	1.3 folds increase in filter paper enzyme activity	
	DBD _{xyr1} -Tmac1AD	滤纸酶活提升 26.5 倍	[77]
	DBD _{xyr1} -Tmac1AD	26.5 folds increase in filter paper enzyme activity	
	DBD _{xyr1} -Tmac1AD	外切酶酶活提升 1.7 倍, 糖化效率提高 60%	[78]
	DBD _{xyr1} -Tmac1AD	1.7 folds increase in exonuclease activity and 60% increase in glycation efficiency	

盒,可以得到总纤维素酶活和底物水解效率均显著提高的重组菌株^[69-70]。Gao 等^[71]在一株高产内切酶的菌株中通过敲除 *cre1*, 并过表达黑曲霉葡萄糖苷酶编码基因 *bglA*, 得到了一株纤维素酶和 β -葡萄糖苷酶活性均显著提高的里氏木霉菌株。该工程菌株的胞外总纤维素酶活性提高 63%, 从而对秸秆残渣具有更高的糖化效率^[71]。本课题组通过利用自主挖掘的里氏木霉铜离子转运蛋白编码基因 *tcu1* 的启动子驱动转录激活因子 Xyr1 的表达, 首次实现里氏木霉纤维素酶在非诱导性碳源(葡萄糖、甘油等)中高水平表达, 且完全解除碳代谢阻遏, 纤维素酶最终表达水平与纤维素诱导条件下的合成水平相当^[37,72]。本课题组近期还发现, Xyr1 中间同源区段 434 位精氨酸突变为亮氨酸时, 组成型表达该 Xyr1 突变体可以使胞外纤维素外切酶以及木聚糖酶活比表达野生型 Xyr1 分别提升 80%和 70%, 且胞外发酵酶液对预处理玉米秸秆的糖化效率提升 21%^[38]。Zhao 等^[41]使用 CRISPR 基因编辑技术将 Xyr1 第 873 位的丙氨酸突变为酪氨酸并对其进行组成型表达, 发现该突变株在葡萄糖条件下的木聚糖酶与纤维素酶产量较出发菌分别提升了 56.7 倍和 3.3 倍; 进一步使用该突变株发酵液处理玉米秸秆, 葡萄糖与木糖释放量相较于出发菌可分别提升 51%和 52%。Arai 等^[73]则通过在里氏木霉中共表达转录激活因子 Ace3 和 Xyr1^{V821F} 突变体, 使得菌株的纤维素酶表达水平比单独过表达 Ace3 和 Xyr1^{V821F} 条件下分别提高 5.5 倍和 1.5 倍。此外, 将 Cre1 的第 388 位丝氨酸突变为缬氨酸以消除其磷酸化修饰, 所得菌株在葡萄糖条件下的滤纸酶活和外切酶酶活(pNPCase)可分别增加了 2.25 倍和 2.45 倍^[74]。

除了对内源转录因子的改造外, 近几年还有研究通过设计人工转录因子来实现对纤维素酶表达的控制。锌指蛋白(zinc finger protein,

ZFP)是一类可以较强亲和性识别结合特定 3 个核苷酸基序的 DNA 结合结构域。通过串联多个识别不同核苷酸基序的锌指蛋白, 并将其与特定转录激活结构域融合, Zhang 等^[75]构建了可在里氏木霉 Rut-C30 中激活靶基因表达的人工锌指蛋白文库, 并由此筛选获得了多个纤维素酶产量提高的突变体, 其中一个突变体 U3 的滤纸酶活和 β -葡萄糖苷酶酶活分别提升了 55%和 8.1 倍。与人工锌指蛋白转录因子策略类似, Zhang 等将 Ace2、Cre1、Xyr1 及 Ace1 的 DNA 结合结构域分别与单纯疱疹病毒的激活结构域 VP16 融合, 其中 DBD_{ace2}-AD_{VP16} 和 DBD_{cre1}-AD_{VP16} 在 Rut-C30 中的表达可分别提升相应重组菌株在纤维素和葡萄糖条件下的纤维素酶酶活; 另外, 表达 DBD_{cre1}-AD_{VP16} 的重组菌株 T_{MTA139} 在葡萄糖条件下的滤纸酶活性较出发菌高出 26.5 倍^[76-77]。本课题组也通过将含有保守的富含半胱氨酸基序的转录因子 Tmac1 的 AD 结构域与 Xyr1 的 DBD 结构域融合构建了人工转录因子 XT, 进一步将该人工转录因子在 Xyr1 缺失菌株中过表达, 得到的 OEXT 菌株与过表达原 Xyr1 的菌株 OEX 以及亲本菌株 QM9414 相比, OEXT 的滤纸酶活分别增加了 0.6 倍和 1.2 倍, 且 OEXT 的木聚糖酶活显著提高, 分别是 OEX 和 QM9414 的 33.8 倍和 8.2 倍^[78]。综上所述, 基于转录调控因子的理性改造是提升里氏木霉纤维素酶产量的有效手段, 将来可通过与蛋白质表达分泌路径其他环节以及细胞全局代谢网络的改造相结合, 可以进一步提升菌株的蛋白分泌生产能力。

5 展望

经过几十年的研究, 人们对里氏木霉纤维素酶基因的表达调控机理有了较为系统的了解, 特别是从胞外碳源信号的感应传导到细

胞核内转录调控因子功能以及染色质结构变化等方面开始逐步揭示了针对纤维素酶基因表达的复杂而严谨的控制网络机制。基于这些研究结果,通过针对性的遗传改造大幅度提升了里氏木霉的纤维素酶表达合成水平。未来仍需从以下几个方面开展更为深入的研究以力争全面揭示里氏木霉纤维素酶诱导表达调控的过程机制。

(1) 明确纤维素诱导的胞内信号本质,并深入揭示其感应与传导途径与机制,对以里氏木霉为代表的丝状真菌如何感应细胞外的水不溶性纤维素,以及纤维素来源的诱导信号如何进行胞内传递而最终触发纤维素酶基因表达等问题做出全面系统的解答,这将为深入理解真核微生物的环境响应与生态适应机制奠定理论基础。

(2) 从菌株改造角度出发,考虑到里氏木霉纤维素酶基因复杂的表达调控网络,有必要在进一步挖掘鉴定相关转录调控因子以及深入解析其功能机制的同时,利用系统生物学策略对众多调控靶点进行集成改造,从基因转录层面优化改善酶系组成,并促使各酶组分基因的转录表达发生更大幅度的跃升,以确保最终胞外水解酶系的提质增量。

(3) 考虑到基因转录只是真核生物蛋白质高水平外泌的第一步,有必要结合遗传学、分子生物学和细胞生物学策略手段,在开发里氏木霉高效基因组编辑技术的基础上,更为全面系统地阐释里氏木霉纤维素酶高效合成全路径中的其他关键或限速环节,包括蛋白质翻译后在胞内特定细胞器中的高效加工处理以及细胞中的高效转运,通过结合细胞中心代谢网络的优化平衡以及菌丝形态改造,全面打造一条可以和基因高水平转录相匹配的蛋白质高水平运输路径,从而最大程度地释放里氏木霉纤

维素酶合成潜力,以有效降低纤维酶生产成本,推动以木质纤维素为原料的绿色生物制造产业的快速发展。

REFERENCES

- [1] ISIKGOR FH, BECER CR. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers[J]. *Polymer Chemistry*, 2015, 6(25): 4497-4559.
- [2] DAS N, JENA PK, PADHI D, KUMAR MOHANTY M, SAHOO G. A comprehensive review of characterization, pretreatment and its applications on different lignocellulosic biomass for bioethanol production[J]. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2023, 13(2): 1503-1527.
- [3] REN FY, WU F, WU X, BAO TT, JIE YC, GAO L. Fungal systems for lignocellulose deconstruction: from enzymatic mechanisms to hydrolysis optimization[J]. *GCB Bioenergy*, 2024, 16(5): e13130.
- [4] KUBICEK CP, STEINDORFF AS, CHENTHAMARA K, MANGANIELLO G, HENRISSAT B, ZHANG J, CAI F, KOPCHINSKIY AG, KUBICEK EM, KUO AL, BARONCELLI R, SARROCCO S, NORONHA EF, VANNACCI G, SHEN QR, GRIGORIEV IV, DRUZHININA IS. Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 485.
- [5] GUPTA VK, STEINDORFF AS, de PAULA RG, SILVA-ROCHA R, MACH-AIGNER AR, MACH RL, SILVA RN. The post-genomic era of *Trichoderma reesei*: what's next?[J]. *Trends in Biotechnology*, 2016, 34(12): 970-982.
- [6] 辛琪, 徐金涛, 汪天虹, 刘巍峰, 陈冠军. 丝状真菌红褐肉座菌(*Hypocrea jecorina*)纤维素酶基因的转录调控研究进展[J]. *微生物学报*, 2010, 50(11): 1431-1437.
XIN Q, XU JT, WANG TH, LIU WF, CHEN GJ. Transcriptional regulation of cellulases and hemicellulases gene in *Hypocrea jecorina*: a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(11): 1431-1437 (in Chinese).
- [7] DONG CD, PATEL AK, MADHAVAN A, CHEN CW, SINGHANIA RR. Significance of glycans in cellulolytic enzymes for lignocellulosic biorefinery: a review[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 379: 128992.
- [8] 张飞, 白凤武, 赵心清. 丝状真菌纤维素酶合成诱导及转录调控[J]. *生物工程学报*, 2016, 32(11):

- 1481-1495.
- ZHANG F, BAI FW, ZHAO XQ. Induction and regulation of cellulase expression in filamentous fungi: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2016, 32(11): 1481-1495 (in Chinese).
- [9] MOMENI MH, ZITTING A, JÄÄMURU V, TURUNEN R, PENTTILÄ P, BUCHKO GW, HILTUNEN S, MAIOROVA N, KOIVULA A, SAPKOTA J, MARJAMAA K, MASTER ER. Insights into the action of phylogenetically diverse microbial expansins on the structure of cellulose microfibrils[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2024, 17(1): 56.
- [10] SUTO M, TOMITA F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 92(4): 305-311.
- [11] LOHR D, VENKOV P, ZLATANOVA J. Transcriptional regulation in the yeast *GAL* gene family: a complex genetic network[J]. FASEB Journal, 1995, 9(9): 777-787.
- [12] ZHANG WX, KOU YB, XU JT, CAO YL, ZHAO GL, SHAO J, WANG H, WANG ZX, BAO XM, CHEN GJ, LIU WF. Two major facilitator superfamily sugar transporters from *Trichoderma reesei* and their roles in induction of cellulase biosynthesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(46): 32861-32872.
- [13] WANG ZX, YANG RF, LV WH, ZHANG WX, MENG XF, LIU WF. Functional characterization of sugar transporter CRT1 reveals differential roles of its C-terminal region in sugar transport and cellulase induction in *Trichoderma reesei*[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(4): e0087222.
- [14] ZNAMEROSKI EA, LI X, TSAI JC, GALAZKA JM, GLASS NL, CATE JHD. Evidence for tranceptor function of cellodextrin transporters in *Neurospora crassa*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(5): 2610-2619.
- [15] YAN S, XU Y, YU XW. Role of cellulose response transporter-like protein CRT2 in cellulase induction in *Trichoderma reesei*[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2023, 16(1): 118.
- [16] NOGUEIRA KMV, de PAULA RG, ANTONIÊTO ACC, dos REIS TF, CARRARO CB, SILVA AC, ALMEIDA F, RECHIA CGV, GOLDMAN GH, SILVA RN. Characterization of a novel sugar transporter involved in sugarcane bagasse degradation in *Trichoderma reesei*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 84.
- [17] LICCARDO F, LUINI A, Di MARTINO R. Endomembrane-based signaling by GPCRs and G-proteins[J]. Cells, 2022, 11(3): 528.
- [18] LATORRACA NR, VENKATAKRISHNAN AJ, DROR RO. GPCR dynamics: structures in motion[J]. Chemical Reviews, 2017, 117(1): 139-155.
- [19] SMRCKA AV. G protein $\beta\gamma$ subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008, 65(14): 2191-2214.
- [20] CABRERA IE, PACENTINE IV, LIM A, GUERRERO N, KRYSSTOFOVA S, LI LD, MICHKOV AV, SERVIN JA, AHRENDT SR, CARRILLO AJ, DAVIDSON LM, BARSOUM AH, CAO J, CASTILLO R, CHEN WC, DINKCHIAN A, KIM S, KITADA SM, LAI TH, MACH A, et al. Global analysis of predicted G protein-coupled receptor genes in the filamentous fungus, *Neurospora crassa*[J]. G3, 2015, 5(12): 2729-2743.
- [21] GRUBER S, OMANN M, ZEILINGER S. Comparative analysis of the repertoire of G protein-coupled receptors of three species of the fungal genus *Trichoderma*[J]. BMC Microbiology, 2013, 13: 108.
- [22] SCHMOLL M, HINTERDOBLER W. Chapter Three-Tools for adapting to a complex habitat: G-protein coupled receptors in *Trichoderma*[J]. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 2022, 193(1): 65-97.
- [23] STAPPLER E, DATTENBÖCK C, TISCH D, SCHMOLL M. Analysis of light- and carbon-specific transcriptomes implicates a class of G-protein-coupled receptors in cellulose sensing[J]. mSphere, 2017, 2(3): e00089-17.
- [24] SEIBEL C, GREMEL G, DO NASCIMENTO SILVA R, SCHUSTER A, KUBICEK CP, SCHMOLL M. Light-dependent roles of the G-protein alpha subunit GNA1 of *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*)[J]. BMC Biology, 2009, 7: 58.
- [25] SCHMOLL M, SCHUSTER A, SILVA RD, KUBICEK CP. The G-alpha protein GNA3 of *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*) regulates cellulase gene expression in the presence of light[J]. Eukaryotic Cell, 2009, 8(3): 410-420.
- [26] COLLIER LA, GHOSH A, BORKOVICH KA. Heterotrimeric G-protein signaling is required for cellulose degradation in *Neurospora crassa*[J]. mBio, 2020, 11(6): e02419-20.
- [27] TISCH D, KUBICEK CP, SCHMOLL M. The

- phosducin-like protein PhLP1 impacts regulation of glycoside hydrolases and light response in *Trichoderma reesei*[J]. BMC Genomics, 2011, 12: 613.
- [28] WANG MY, ZHAO QS, YANG JH, JIANG BJ, WANG FZ, LIU KM, FANG X. A mitogen-activated protein kinase Tmk3 participates in high osmolarity resistance, cell wall integrity maintenance and cellulase production regulation in *Trichoderma reesei*[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e72189.
- [29] WANG ZX, AN N, XU WQ, ZHANG WX, MENG XF, CHEN GJ, LIU WF. Functional characterization of the upstream components of the Hog1-like kinase cascade in hyperosmotic and carbon sensing in *Trichoderma reesei*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 97.
- [30] WANG MY, ZHANG ML, LI L, DONG YM, JIANG Y, LIU KM, ZHANG RQ, JIANG BJ, NIU KL, FANG X. Role of *Trichoderma reesei* mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in cellulase formation[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10: 99.
- [31] ZHANG JW, ZHANG YM, ZHONG YH, QU YB, WANG TH. Ras GTPases modulate morphogenesis, sporulation and cellulase gene expression in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e48786.
- [32] LI N, QIU ZY, CAI WC, SHEN YL, WEI DZ, CHEN YM, WANG W. The Ras small GTPase RSR1 regulates cellulase production in *Trichoderma reesei*[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2023, 16(1): 87.
- [33] SCHUSTER A, TISCH D, SEIDL-SEIBOTH V, KUBICEK CP, SCHMOLL M. Roles of protein kinase A and adenylate cyclase in light-modulated cellulase regulation in *Trichoderma reesei*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(7): 2168-2178.
- [34] NOGUEIRA KMV, COSTA MD, de PAULA RG, MENDONÇA-NATIVIDADE FC, RICCI-AZEVEDO R, SILVA RN. Evidence of cAMP involvement in cellobiohydrolase expression and secretion by *Trichoderma reesei* in presence of the inducer sophorose[J]. BMC Microbiology, 2015, 15: 195.
- [35] ELLILÄ S, FONSECA L, UCHIMA C, COTA J, GOLDMAN GH, SALOHEIMO M, SACON V, SIIKA-AHO M. Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10: 30.
- [36] ZHANG WX, GUO JQ, WU XX, REN YJ, LI CY, MENG XF, LIU WF. Reformulating the hydrolytic enzyme cocktail of *Trichoderma reesei* by combining XYR1 overexpression and elimination of four major cellulases to improve saccharification of corn fiber[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(1): 211-222.
- [37] LV XX, ZHENG FL, LI CY, ZHANG WX, CHEN GJ, LIU WF. Characterization of a copper responsive promoter and its mediated overexpression of the xylanase regulator 1 results in an induction-independent production of cellulases in *Trichoderma reesei*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8: 67.
- [38] LV DM, ZHANG WX, MENG XF, LIU WF. Single mutation in transcriptional activator Xyr1 enhances cellulase and xylanase production in *Trichoderma reesei* on glucose[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(31): 11993-12003.
- [39] MELLO-DE-SOUSA TM, GORSCHER R, JOVANOVIĆ B, MACH RL, MACH-AIGNER AR. *In vitro* characterization of a nuclear receptor-like domain of the xylanase regulator 1 from *Trichoderma reesei*[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(12): 1254.
- [40] DERNTL C, GUDYNAITE-SAVITCH L, CALIXTE S, WHITE T, MACH RL, MACH-AIGNER AR. Mutation of the Xylanase regulator 1 causes a glucose blind hydrolase expressing phenotype in industrially used *Trichoderma* strains[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6(1): 62.
- [41] ZHAO QQ, YANG ZZ, XIAO ZY, ZHANG Z, XING J, LIANG HQ, GAO LW, ZHAO J, QU YB, LIU GD. Structure-guided engineering of transcriptional activator XYR1 for inducer-free production of lignocellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei*[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2023, 8(4): 732-740.
- [42] ZHANG JJ, CHEN YM, WU C, LIU P, WANG W, WEI DZ. The transcription factor ACE3 controls cellulase activities and lactose metabolism via two additional regulators in the fungus *Trichoderma reesei*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2019, 294(48): 18435-18450.
- [43] ZHENG FL, CAO YL, YANG RF, WANG L, LV XX, ZHANG WX, MENG XF, LIU WF. *Trichoderma reesei* XYR1 activates cellulase gene expression via interaction with the Mediator subunit TrGAL11 to recruit RNA polymerase II[J]. PLoS Genetics, 2020, 16(9): e1008979.
- [44] CAO YL, ZHENG FL, ZHANG WX, MENG XF, LIU

- WF. *Trichoderma reesei* XYR1 recruits SWI/SNF to facilitate cellulase gene expression[J]. *Molecular Microbiology*, 2019, 112(4): 1145-1162.
- [45] WANG L, ZHANG WX, CAO YL, ZHENG FL, ZHAO GL, LV XX, MENG XF, LIU WF. Interdependent recruitment of CYC8/TUP1 and the transcriptional activator XYR1 at target promoters is required for induced cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*[J]. *PLoS Genetics*, 2021, 17(2): e1009351.
- [46] XIONG LL, KAMESHWAR AKS, CHEN X, GUO ZY, MAO CQ, CHEN SF, QIN WS. The ACEII recombinant *Trichoderma reesei* QM9414 strains with enhanced xylanase production and its applications in production of xylitol from tree barks[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 215.
- [47] STRICKER AR, TREFFLINGER P, ARO N, PENTTILÄ M, MACH RL. Role of Ace2 (Activator of Cellulases 2) within the xyn2 transcriptosome of *Hypocrea jecorina*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2008, 45(4): 436-445.
- [48] HÄKKINEN M, VALKONEN MJ, WESTERHOLM-PARVINEN A, ARO N, ARVAS M, VITIKAINEN M, PENTTILÄ M, SALOHEIMO M, PAKULA TM. Screening of candidate regulators for cellulase and hemicellulase production in *Trichoderma reesei* and identification of a factor essential for cellulase production[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 14.
- [49] ANTONIÊTO ACC, de PAULA RG, CASTRO LD, SILVA-ROCHA R, PERSINOTI GF, SILVA RN. *Trichoderma reesei* CRE1-mediated carbon catabolite repression in re-sponse to sophorose through RNA sequencing analysis[J]. *Current Genomics*, 2016, 17(2): 119-131.
- [50] TAKASHIMA S, IIKURA H, NAKAMURA A, MASAKI H, UOZUMI T. Analysis of Cre1 binding sites in the *Trichoderma reesei* cbh1 upstream region[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, 145(3): 361-366.
- [51] RIES L, BELSHAW NJ, ILMÉN M, PENTTILÄ ME, ALAPURANEN M, ARCHER DB. The role of CRE1 in nucleosome positioning within the cbh1 promoter and coding regions of *Trichoderma reesei*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(2): 749-762.
- [52] SEIDL V, GAMAUF C, DRUZHININA IS, SEIBOTH B, HARTL L, KUBICEK CP. The *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) hypercellulolytic mutant Rut-C30 lacks an 85 kb (29 gene-encoding) region of the wild-type genome[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 327.
- [53] NAKARI-SETÄLÄ T, PALOHEIMO M, KALLIO J, VEHEMAANPERÄ J, PENTTILÄ M, SALOHEIMO M. Genetic modification of carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* for improved protein production[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(14): 4853-4860.
- [54] ZHU ZH, ZOU G, CHAI SX, XIAO ML, WANG YM, WANG PP, ZHOU ZH. The protein methyltransferase TrSAM inhibits cellulase gene expression by interacting with the negative regulator ACE1 in *Trichoderma reesei*[J]. *Communications Biology*, 2024, 7(1): 375.
- [55] CHEN YM, LIN AB, LIU P, FAN XJ, WU C, LI N, WEI LJ, WANG W, WEI DZ. *Trichoderma reesei* ACE4, a novel transcriptional activator involved in the regulation of cellulase genes during growth on cellulose[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(15): e0059321.
- [56] WANG L, LV XX, CAO YL, ZHENG FL, MENG XF, SHEN Y, CHEN GJ, LIU WF, ZHANG WX. A novel transcriptional regulator RXE1 modulates the essential transactivator XYR1 and cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(11): 4511-4523.
- [57] CAO YL, ZHENG FL, WANG L, ZHAO GL, CHEN GJ, ZHANG WX, LIU WF. Rce1, a novel transcriptional repressor, regulates cellulase gene expression by antagonizing the transactivator Xyr1 in *Trichoderma reesei*[J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 105(1): 65-83.
- [58] WANG L, YANG RF, CAO YL, ZHENG FL, MENG XF, ZHONG YH, CHEN GJ, ZHANG WX, LIU WF. CLP1, a novel plant homeo domain protein, participates in regulating cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1700.
- [59] MENG QS, ZHANG F, LIU CG, ZHAO XQ, BAI FW. Identification of a novel repressor encoded by the putative gene ctf1 for cellulase biosynthesis in *Trichoderma reesei* through artificial zinc finger engineering[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(6): 1747-1760.
- [60] YANG YY, XIE PD, LI YC, BI Y, PRUSKY DB. Updating insights into the regulatory mechanisms of calcineurin-activated transcription factor Crz1 in pathogenic fungi[J]. *Journal of Fungi*, 2022, 8(10): 1082.

- [61] CHEN L, ZOU G, WANG JZ, WANG J, LIU R, JIANG YP, ZHAO GP, ZHOU ZH. Characterization of the Ca²⁺-responsive signaling pathway in regulating the expression and secretion of cellulases in *Trichoderma reesei* Rut-C30[J]. *Molecular Microbiology*, 2016, 100(3): 560-575.
- [62] ZHAO YY, CAO CL, LIU YL, WANG J, LI J, LI SY, DENG Y. Identification of the genetic requirements for zinc tolerance and toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *G3*, 2020, 10(2): 479-488.
- [63] LI N, LI J, CHEN YM, SHEN YL, WEI DZ, WANG W. Mechanism of Zn²⁺ regulation of cellulase production in *Trichoderma reesei* Rut-C30[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2023, 16(1): 73.
- [64] XIN Q, GONG YJ, LV XX, CHEN GJ, LIU WF. *Trichoderma reesei* histone acetyltransferase Gcn5 regulates fungal growth, conidiation, and cellulase gene expression[J]. *Current Microbiology*, 2013, 67(5): 580-589.
- [65] SEIBOTH B, KARIMI RA, PHATALE PA, LINKE RT, HARTL L, SAUER DG, SMITH KM, BAKER SE, FREITAG M, KUBICEK CP. The putative protein methyltransferase LAE1 controls cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 84(6): 1150-1164.
- [66] CAO YL, YANG RF, ZHENG FL, MENG XF, ZHANG WX, LIU WF. Dual regulatory role of chromatin remodeler ISW1 in coordinating cellulase and secondary metabolite biosynthesis in *Trichoderma reesei*[J]. *mBio*, 2021, 13(1): e0345621.
- [67] PETERSON R, NEVALAINEN H. *Trichoderma reesei* Rut-C30: thirty years of strain improvement[J]. *Microbiology*, 2012, 158(Pt 1): 58-68.
- [68] BISCHOF RH, RAMONI J, SEIBOTH B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 106.
- [69] MENG QS, LIU CG, ZHAO XQ, BAI FW. Engineering *Trichoderma reesei* Rut-C30 with the overexpression of *egl1* at the *ace1* locus to relieve repression on cellulase production and to adjust the ratio of cellulolytic enzymes for more efficient hydrolysis of lignocellulosic biomass[J]. *Journal of Biotechnology*, 2018, 285: 56-63.
- [70] XIA Y, YANG LR, XIA LM. Combined strategy of transcription factor manipulation and β -glucosidase gene overexpression in *Trichoderma reesei* and its application in lignocellulose bioconversion[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2018, 45(9): 803-811.
- [71] GAO J, QIAN YC, WANG YF, QU YB, ZHONG YH. Production of the versatile cellulase for cellulose bioconversion and cellulase inducer synthesis by genetic improvement of *Trichoderma reesei*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 272.
- [72] ZHENG FL, YANG RF, CAO YL, ZHANG WX, LV XX, MENG XF, ZHONG YH, CHEN GJ, ZHOU QX, LIU WF. Engineering *Trichoderma reesei* for hyperproduction of cellulases on glucose to efficiently saccharify pretreated corncobs[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(45): 12671-12682.
- [73] ARAI T, ICHINOSE S, SHIBATA N, KAKESHITA H, KODAMA H, IGARASHI K, TAKIMURA Y. Inducer-free cellulase production system based on the constitutive expression of mutated XYR1 and ACE3 in the industrial fungus *Trichoderma reesei*[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 19445.
- [74] HAN LJ, TAN YS, MA W, NIU KL, HOU SL, GUO W, LIU YC, FANG X. Precision engineering of the transcription factor *cre1* in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) for efficient cellulase production in the presence of glucose[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 852.
- [75] ZHANG F, BAI FW, ZHAO XQ. Enhanced cellulase production from *Trichoderma reesei* Rut-C30 by engineering with an artificial zinc finger protein library[J]. *Biotechnology Journal*, 2016, 11(10): 1282-1290.
- [76] ZHANG JJ, WU C, WANG W, WANG W, WEI DZ. Construction of enhanced transcriptional activators for improving cellulase production in *Trichoderma reesei* RUT C30[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2018, 5(1): 40.
- [77] ZHANG JJ, ZHANG GX, WANG W, WANG W, WEI DZ. Enhanced cellulase production in *Trichoderma reesei* Rut-C30 via constitution of minimal transcriptional activators[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 75.
- [78] LV DM, ZHANG WX, MENG XF, LIU WF. A novel fusion transcription factor drives high cellulase and xylanase production on glucose in *Trichoderma reesei*[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 370: 128520.