

基于金针菇全基因组的赖氨酸合成途径关键酶分析

刘建雨 王瑞娟 张丹 尚晓冬* 谭琦

(上海市农业科学院食用菌研究所 农业部应用真菌资源与利用重点开放实验室
国家食用菌工程技术研究中心 上海市农业遗传育种重点实验室 上海 201403)

摘要:【目的】以金针菇全基因组测序数据为基础研究其 L-赖氨酸的从头合成途径及其关键基因。【方法】采用 Illumina Hiseq2000 和 Roche454 FLX+两种方法完成金针菇单孢菌株 Dan3 的基因组测序, 基于全基因组序列筛选金针菇中赖氨酸生物合成的关键基因, 并分析这些基因编码的蛋白质基本理化性质; 预测其亚细胞定位情况及蛋白的二级结构。【结果】金针菇 Dan3 全基因组序列长度为 34.17 Mb, 预测到 8 个参与 α -氨基己二酸途径的关键基因, 这些基因都含有多个内含子和外显子, 二级结构主要由 α -螺旋和无规则卷曲组成, 有 3 个蛋白定位于线粒体。【结论】金针菇是通过 α -氨基己二酸途径合成赖氨酸, 基因组中预测到与该途径相关的几乎所有的酶。

关键词: 金针菇, 赖氨酸生物合成, α -氨基己二酸途径

Analysis of genes related to lysine biosynthesis based on whole genome of *Flammulina velutipes*

LIU Jian-Yu WANG Rui-Juan ZHANG Dan SHANG Xiao-Dong* TAN Qi

(Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture, National Engineering Research Center of Edible Fungi, Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201403, China)

Abstract: [Objective] To analyze lysine biosynthetic pathway and related genes based on the whole genome of *Flammulina velutipes*. [Methods] Genome sequence of the monosporous strain Dan3 was sequenced through Illumina Hiseq2000 and Roche454 FLX+. Key genes related to lysine biosynthesis pathway were screened based on the whole genome. Basic physical and chemical properties of these proteins were analyzed, and the subcellular localization and secondary structure were predicted. [Results] The sequenced reads were assembled and 34.17 Mb length genome sequence of Dan3 was obtained. The structure of 8 key genes involved in α -aminoadipate pathway was identified. Each gene was composed of a number of introns and exons, and the secondary structure was mainly composed of α -helix and irregular curl. Three of these proteins were localized to the mitochondria. [Conclusion]

Foundation item: Foundation of Shanghai Seed Industry Development (No. 2014-10SAAS); Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (No. G20150501)

*Corresponding author: Tel: 86-21-62209760; E-mail: xdshang@163.com

Received: May 11, 2016; Accepted: August 11, 2016; Published online (www.cnki.net): September 07, 2016
基金项目: 上海种业专项项目(No. 2014-10SAAS); 上海市科技兴农重点攻关项目(No. G20150501)

*通讯作者: Tel: 86-21-62209760; E-mail: xdshang@163.com

收稿日期: 2016-05-11; 接受日期: 2016-08-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-09-07

The *de novo* biosynthesis of lysine in *F. velutipes* was through the α -aminoadipate pathway, and almost all enzymes involved in this pathway were predicted in the whole genome of *F. velutipes*.

Keywords: *Flammulina velutipes*, Lysine biosynthesis, α -Aminoadipate pathway

金针菇 *Flammulina velutipes* (Fr.) Singer, 是目前我国人均消费量最多的菌菇之一, 是世界上著名的药食两用菌, 具有较高的营养价值和药用价值^[1]。金针菇中含有蛋白质、脂肪、粗纤维、多种维生素、胡萝卜素等有益成分, 其中氨基酸的含量非常丰富, 孙宇峰等从金针菇中检测出 18 种氨基酸, 人体所必需的 8 种氨基酸占总量的 44.5%, 高于一般的菇类^[2], 尤其是赖氨酸的含量特别高。高含量的赖氨酸能促进儿童生长发育、增强记忆、提高智力。在日本, 金针菇是儿童保健和智力开发的必需食品, 被称之为“增智菇”。

L-赖氨酸(L-lysine)的生物合成在不同生物体内有完全不同的两条途径。大多数细菌和绿色植物的 L-赖氨酸的合成是通过 L-天冬氨酸为起始物的二氨基庚二酸途径(DAP 途径)。真菌、眼虫以及少数细菌则是以 α -酮戊二酸(α -Ketoglutarate)为起始物的氨基己二酸途径(α -Aminoadipate pathway, AAA 途径)^[3-4]。

氨基己二酸途径是谷氨酸族氨基酸合成途径中的一部分^[5]。该途径通过 7 个中间产物 8 个酶促反应生成 L-赖氨酸^[6]。 α -酮戊二酸有 5 个碳原子, 而赖氨酸有 6 个碳原子。因此 α -酮戊二酸形成赖氨酸需延长碳链。第一步是 α -酮戊二酸在高柠檬酸合酶(Homocitrate synthase, HCS)的催化下, 与乙酰辅酶 A 作用, 形成高柠檬酸。高柠檬酸在高柠檬酸脱水酶(Homocitrate dehydratase, HCD)催化下脱水形成顺-高乌头酸(*cis*-Homoaconitate), 后者再由高乌头酸水合酶(Homoaconitate hydratase, HAH)催化形成高异柠檬酸(Homoisocitrate), 然后在高异柠檬酸脱氢酶(Homoisocitrate dehydrogenase, HIDH)催化下, 形成 α -酮己二酸(α -Ketoadipate), 该反应所需辅酶为 NAD^+ , 反应过程中脱去羧基。

α -酮己二酸的形成提供了 L-赖氨酸的碳骨架结构, 随后 α -酮己二酸在氨基己二酸转氨酶(Aminoadipate aminotransferase, AAT)作用下, 以

谷氨酸为底物生成 α -氨基己二酸和 α -酮戊二酸。 α -氨基己二酸在其还原酶(Aminoadipate reductase, AAR)的催化下, 形成 α -氨基己二酸- δ -半醛(α -Aminoadipate- δ -semialdehyde)。己醛基团一旦形成, 在 α -氨基己二酸- δ -半醛-谷氨酸还原酶(即酵母氨酸还原酶, Saccharopine reductase, SDR)作用下, 即与谷氨酸在氨基部位缩合, 形成酵母氨酸(Saccharopine)。酵母氨酸在酵母氨酸脱氢酶[Saccharopine dehydrogenase (NAD^+ , L-lysine-forming), SDH]作用下, 氧化裂解形成 L-赖氨酸。

赖氨酸作为人类第一限制性氨基酸在金针菇中含量甚高, 这已经被很多科学家证实, 然而迄今为止很少有关于金针菇赖氨酸合成途径及相关基因的报道^[7]。本研究基于金针菇的全基因组序列, 构建了金针菇中 L-赖氨酸的从头合成途径, 分析了该途径中的关键酶基因, 对关键基因进行了理化性质研究以及生物信息学分析。结果表明金针菇是通过 α -氨基己二酸途径合成赖氨酸, 金针菇基因组中预测到该途径中几乎所有的酶。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

金针菇(*Flammulina velutipes*)单核菌株 Dan3 由上海市农业科学院食用菌所良种创新与繁育研究室保存并提供。

1.2 基因组测序

基因组测序由上海市农业科学院食用菌所良种创新与繁育研究室委托上海美吉生物医药科技有限公司完成。测序采用 Illumina Hiseq2000 和 Roche454 FLX+两种方法完成。同时委托该公司对测序数据进行了原始数据统计、基因组组装、基因预测、基因功能注释等。基因预测利用 AUGUSTUS (version 2.3.1)软件。将预测基因的蛋白序列分别与 Nr、Genes、String、GO、Swiss-port 和 Uniprot 数据库进行 BLASTp 比对(BLAST 2.2.24+), 从而获得预测基因的注释信息。

1.3 L-赖氨酸合成途径基因的筛选

以 KEGG 公布的赖氨酸生物合成途径(Lysine biosynthesis, map00300)为研究基础^[8], 从这些合成途径上筛选金针菇中赖氨酸生物合成关键基因。

1.4 L-赖氨酸合成途径关键基因的重预测

将筛选到的基因序列分别向上游和下游各延伸 5 kb, 利用 Softberry 网站提供的 FGENESH 在线软件^[9], 以 *Laccaria* (generic) 为模板, 进行基因重预测并得到相应基因的一级结构。将得到的氨基酸序列与 NCBI Nr 数据库再次进行 BLASTp 比对, 从而确认该基因的注释信息, 保证后续研究的准确性。

1.5 L-赖氨酸合成途径关键基因的生物信息学分析

利用 ProtParam 分析了预测的蛋白基本理化性质^[10]; 使用 TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 预测其亚细胞定位; 利用 SOPMA 预测了基因编码蛋白的二级结构^[11]。

2 结果与分析

2.1 基因组测序

采用 Illumina Hiseq2000 和 Roche454 FLX+ 两种方法获得原始数据后, 首先, 利用 Newbler v2.8 对 454 Shotgun 文库进行基于 Overlap 的拼接, 获得 Contig 序列, 把这些 Contig 作为长序列, 加上 Illumina 修剪后的 PE (Paired-end) 和 MP (Mate-pair) 数据, 用软件 Velvet 1.2.07 选择多个不同的 Kmer 参数进行组合拼接, 得到最优的组装结果。其次, 运用 GapCloser 软件对组装结果进行局部内洞填充和碱基校正。

拼接组装后, 金针菇单孢菌株 Dan3 基因组大小总计为 34.17 Mb, 153 个 Scaffolds。共预测到 12 351 个基因, 基因总长 22 862 927 bp, 预测基因长度占基因组比例为 62.55%, 平均长度为 1 851 bp。

2.2 L-赖氨酸合成途径关键基因筛选

运用 BLAST 算法(BLASTx/BLASTp 2.2.24+) 将所获得的预测基因与 KEGG 的基因数据库 (Genes) 进行比对, 根据比对得到的 KO 编号可以获得相应基因参与的具体生物学通路。Dan3 基因组中有 3 075 个基因被注释到 KO 条目, 占总基因数的

24.90%, 涉及 KEGG 数据库中 287 个 Pathway。与 L-赖氨酸合成途径 (map00300) 相关的基因共有 11 个(图 1), 其中 DAP 途径只预测到 3 个基因: 天冬氨酸激酶(Aspartate kinase, EC2.7.2.4)、天冬氨酸半醛脱氢酶(Aspartate-semialdehyde dehydrogenase, EC1.2.1.11) 和高丝氨酸脱氢酶(Aomoserine dehydrogenase, EC1.1.1.30)。而该途径中其它大部分酶并没有被预测到。由此可知, 正如前人的研究报道一样, 属于真菌的金针菇中并不存在 DAP 途径。而 AAA 途径中预测到了 8 个酶的存在(图 1, 表 1), 由此证明金针菇中 L-赖氨酸的生物合成是通过 AAA 途径。我们构建了如图 2 所示的金针菇 L-赖氨酸生物合成途径。

2.3 金针菇赖氨酸合成途径关键基因的生物信息学分析

2.3.1 高柠檬酸合酶: HCS 参与 α -氨基己二酸途径的第一步反应, 催化 α -酮戊二酸和乙酰辅酶 A 缩合形成高柠檬酸, 该反应被认为是 α -氨基己二酸途径的关键限速步骤^[12]。HCS 的活性在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*) 中已经被深入研究^[13-14]。金针菇基因组中, gene1846 被预测为 HCS。通过分析, 其序列一级结构特征如图 3, DNA 全长 1 793 bp, 包括 7 个内含子 8 个外显子, ORF 全长 1 395 bp, 编码 464 个氨基酸, 分子量为 50.70 kD, 理论等电点为 5.78。结构域分析显示该蛋白属于酵母 LYS21 家族(图 4A), 蛋白序列与陶兰柱担菌 *Cylindrobasidium torrendii* 的 HCS (Accession No. K1Y62754) 相似性最高, 达 92%。二级结构预测显示(图 4A), 该段序列含有较高比例的 α -螺旋(45.26%) 和无规则卷曲(29.96%)。亚细胞定位预测该蛋白没有信号肽, 这与 *S. cerevisiae* 中的 HCS 酶不同, 后者的 HCS 属于线粒体酶^[12]。

2.3.2 高乌头酸水合酶: HAH 催化顺-高乌头酸结合一个水分子形成高异柠檬酸。在 *S. cerevisiae* 中由 LYS4 基因编码^[15], 是一个线粒体酶, 受赖氨酸和谷氨酸的调控抑制。该酶的催化机制至今尚不明确, 有可能与顺乌头酸酶相似^[16]。金针菇基因组中, gene1049 被预测为 HAH, 其一级结构特征见图 3,

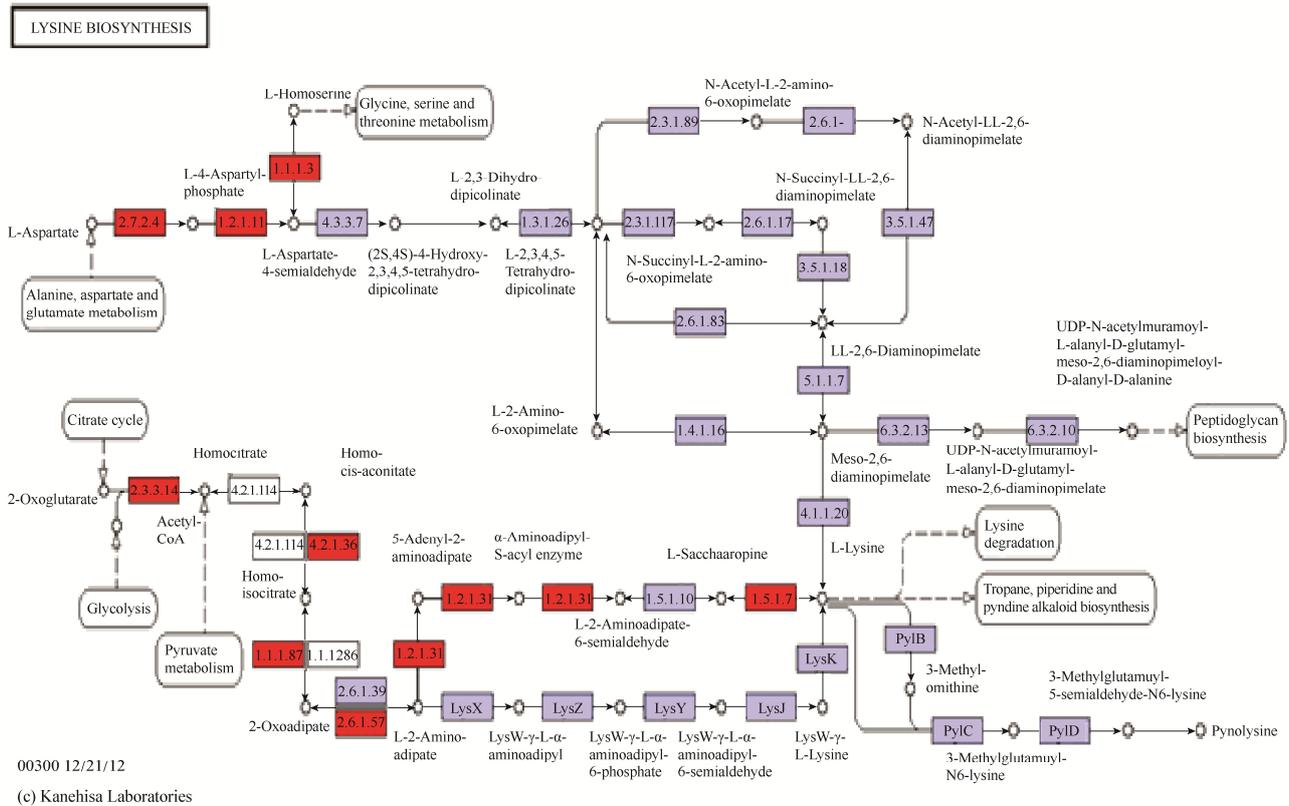


图 1 金针菇基因组中预测到的 L-赖氨酸合成途径中的相关基因

Figure 1 Predicted genes related to L-lysine biosynthetic pathway identified by *F. velutipes* genome

注：图片来自上海美吉生物医药科技有限公司基因组注释结果。

Note: The picture comes from the genome annotation by Shanghai Majorbio Medicine Technology Co Ltd.

表 1 金针菇基因组中预测到的氨基己二酸途径相关基因
Table 1 Predicted genes related to AAA pathway from *F. velutipes* genome

| 基因编号 No. of gene | 酶 Enzyme | 酶号 No. of enzyme |
|---------------------|---|---------------------|
| gene1846 | 高柠檬酸合酶 Homocitrate synthase (HCS) | EC2.3.3.14 |
| gene1049 | 高乌头酸水合酶 Homoaconitate hydratase (HAH) | EC4.2.1.36 |
| gene4911 | 高异柠檬酸脱氢酶 Homoisocitrate dehydrogenase (HIDH) | EC1.1.1.87 |
| gene3816 | 氨基己二酸转氨酶 Amino adipate aminotransferase (AAT) | EC2.6.1.39 |
| gene4872 | 氨基己二酸转氨酶 Amino adipate aminotransferase (AAT) | EC2.6.1.39 |
| gene5701 | δ-腺苷-α-氨基己二酸合酶 δ-Adenylyl-α-amino adipate synthase | EC1.2.1.31 |
| gene7226 | 氨基己二酸还原酶 Amino adipate reductase (AAR) | EC1.2.1.31 |
| gene6165 | 酵母氨酸脱氢酶 Saccharopine dehydrogenase (SDH) | EC1.5.1.7 |

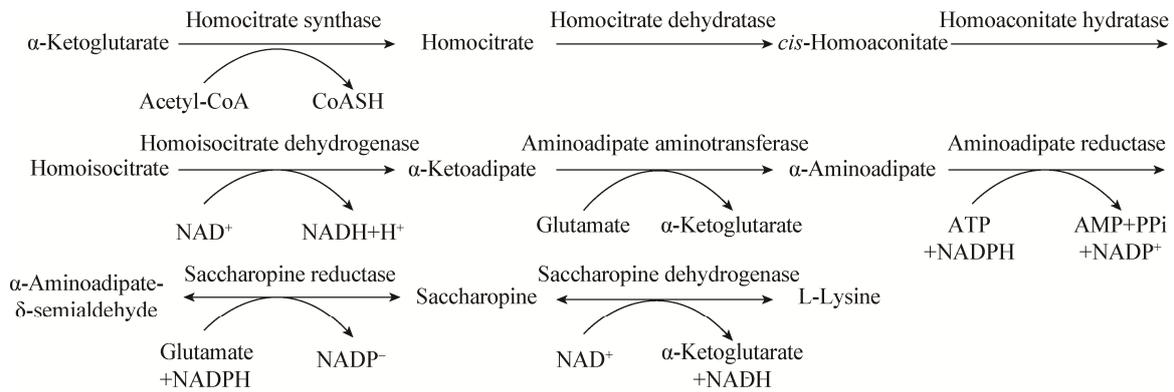


图2 金针菇 L-赖氨酸的从头合成途径
Figure 2 *F. Velutipes de novo* L-lysine biosynthesis

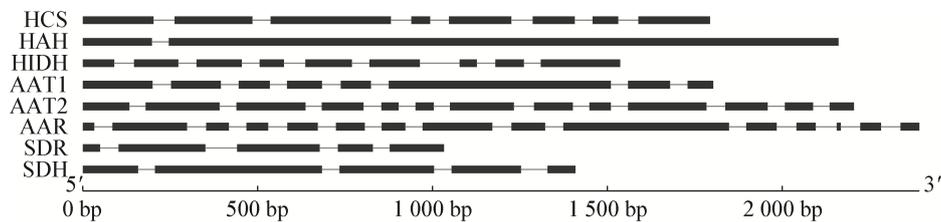


图3 金针菇 L-赖氨酸合成途径中关键酶的一级结构图

Figure 3 The primary structure of key enzymes in L-lysine biosynthetic pathway from *F. velutipes* genome

注: 外显子和内含子分别用粗线条和细线条表示。

Note: Exons are shown as thick lines and introns as thin lines.

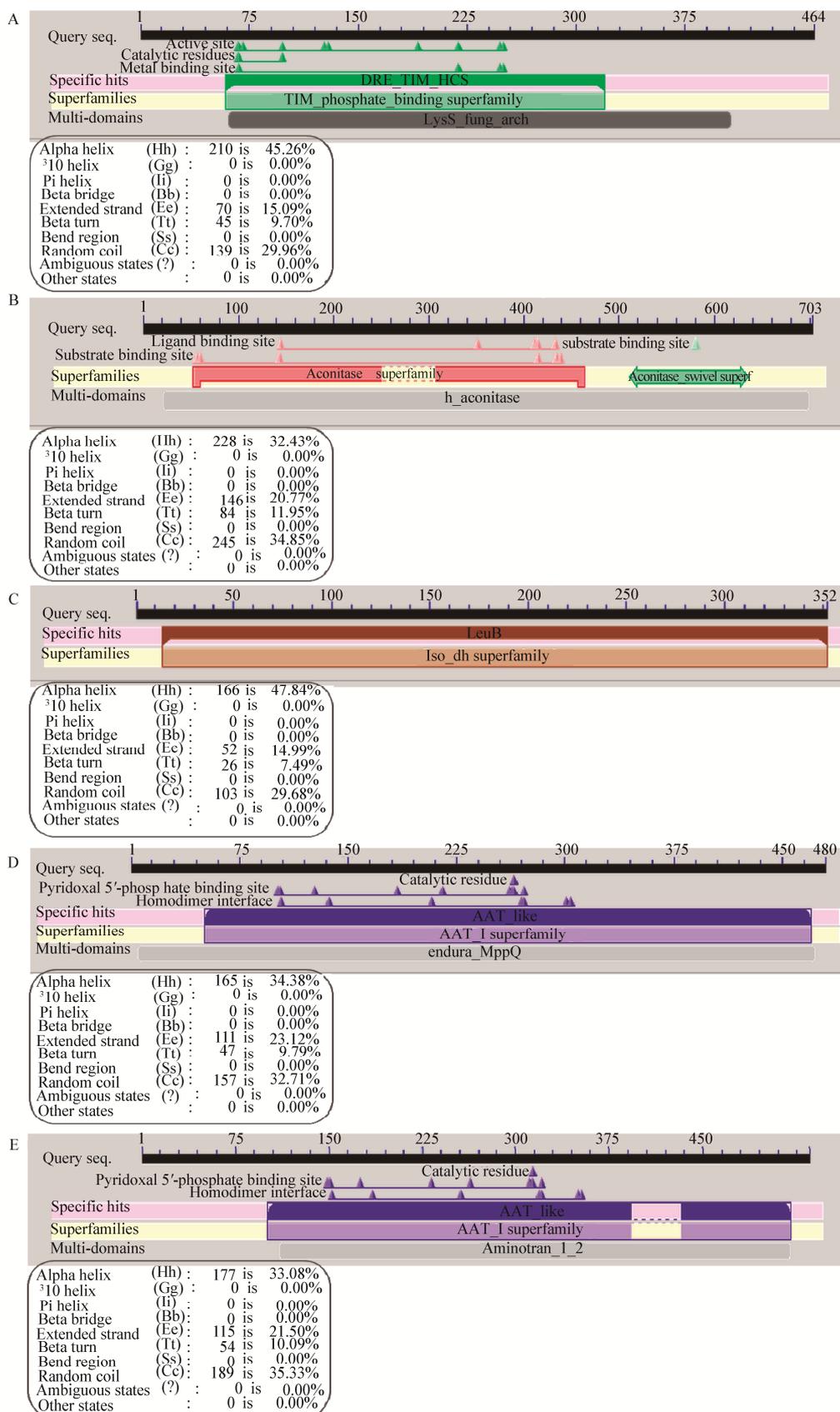
序列全长 2 161 bp, 包括 1 个内含子 2 个外显子, ORF 全长 2 112 bp, 编码 703 个氨基酸, 分子量为 74.90 kD, 理论等电点 5.75。结构域分析显示该蛋白属于顺乌头酸酶家族(Aconitase superfamily, 图 4B), 蛋白序列与 *C. torrendii* 的 HAH (Accession No. K1Y68848)相似性最高, 达 82%。二级结构预测显示(图 4B), 该段序列含有较高比例的 α -螺旋(32.43%)和无规则卷曲(34.85%)。亚细胞定位预测其定位于线粒体(表 2)。

2.3.3 高异柠檬酸脱氢酶: HIDH 催化高异柠檬酸生成 α -酮己二酸, 为 L-赖氨酸合成提供碳骨架结构。金针菇基因组中, gene4911 预测为 HIDH, 一级结构特征显示(图 3), 其序列全长 1 536 bp, 包含 8 个内含子 9 个外显子, ORF 全长 1 044 bp, 编码 347 个氨基酸, 分子量为 37.32 kD, 理论等电点 5.80。结构域分析显示该蛋白属于异柠檬酸脱氢酶家族(Iso-dh superfamily, 图 4C), 蛋白序列与 *C. torrendii* 的 HIDH (Accession No. K1Y69758)相似性最高, 达

79%。二级结构显示(图 4C), 该段序列具有较高的 α -螺旋(47.84%)和无规则卷曲(39.68%)。亚细胞定位预测其定位于线粒体(表 2)。

2.3.4 氨基己二酸转氨酶: AAT 是一个依赖于 5'-磷酸吡哆醛(Pyridoxal 5'-phosphate)的酶(PLP-dependent enzyme), 它负责催化 α -酮己二酸生成 α -氨基己二酸, 由 L-谷氨酸作为氨基供体。从酿酒酵母中分离到两个氨基己二酸转氨酶^[17]。

在金针菇基因组中, 我们也预测到有两个基因(gene3816 和 gene4872)编码氨基己二酸转氨酶(AAT1 和 AAT2)。序列一级结构特征如图 3 所示, 序列全长分别为 1 802 bp 和 2 205 bp, 分别包含 7 个内含子和 8 个外显子, 以及 12 个内含子和 13 个外显子。ORF 全长分别为 1 443 bp 和 1 608 bp, 分别编码 480 和 535 个氨基酸, 分子量分别为 54.21 kD 和 59.33 kD, 理论等电点 5.12 和 6.52。结构域分析显示 AAT1 和 AAT2 都属于氨基转移酶家族(图 4D 和图 4E)。AAT1 蛋白序列与 *C. torrendii* 的芳香族氨基酸



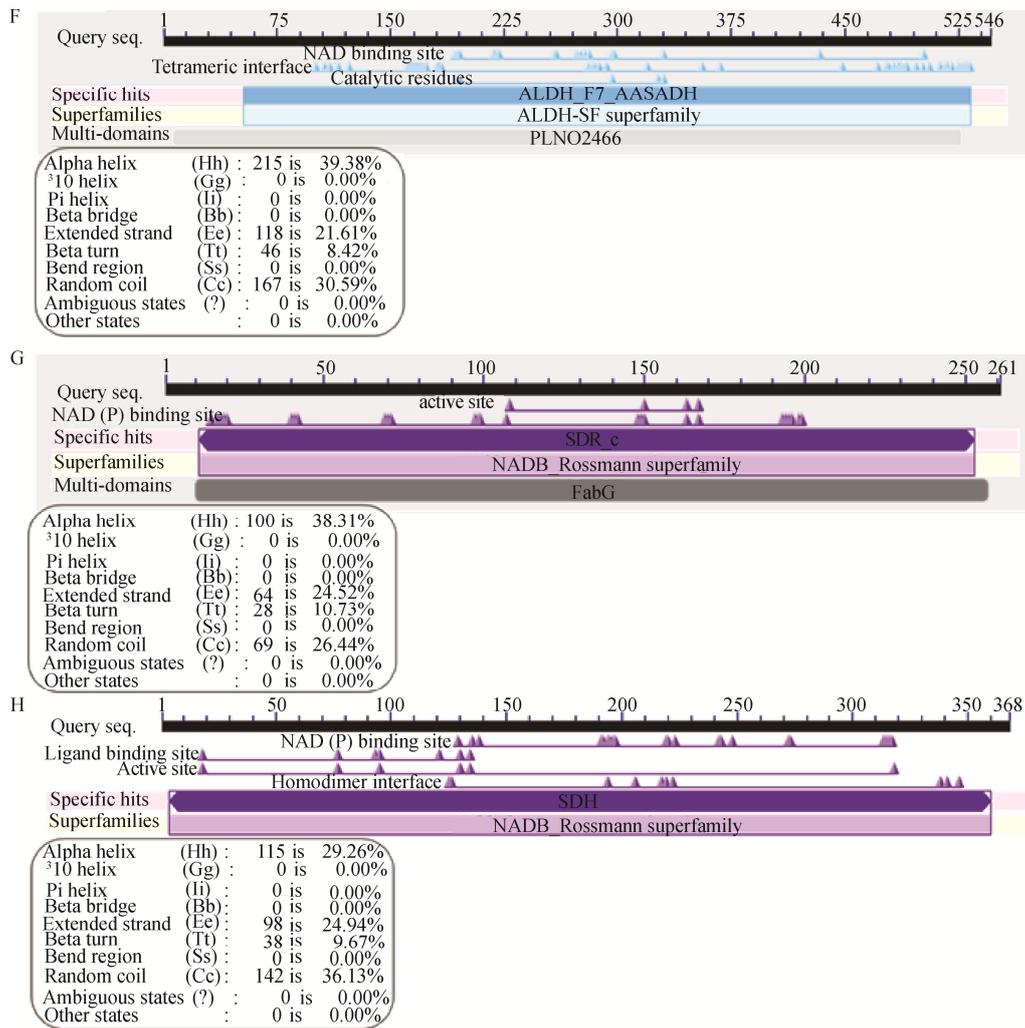


图 4 金针菇 L-赖氨酸合成途径中关键酶的结构域和二级结构分析

Figure 4 The secondary structure and functional domain of enzymes in L-lysine biosynthetic pathway from *F. velutipes* genome

注：A、B、C、D、E、F、G 和 H 分别表示 HCS、HAH、HIDH、AAT1、AAT2、AAR、SDR 和 SDH 蛋白的结构域分析和二级结构分析的结果。

Note: A, B, C, D, E, F, G and H represents the functional domain and the secondary structure of the HCS, HAH, HIDH, AAT1, AAT2, AAR, SDR and SDR, respectively.

转移酶 Aro8 (Accession No. K1Y71393)相似性最高,达 53%。AAT2 蛋白序列与 *C. torrendii* 的 PLP-dependent transferase (Accession No. K1Y73729)相似性最高,达 71%。二级结构预测显示(图 4D 和图 4E)两段序列都具有较高的 α 螺旋(34.38%和 33.08%)和无规则卷曲(32.71%和 35.33%), β 转角占 9.79%和 10.09%。

2.3.5 氨基己二酸还原酶: AAR 酶催化的反应是目前仅在真菌中发现而且唯一一个同时发生腺苷酸

化和还原反应的过程^[18]。在早期的基础研究中, AAR 催化的反应被认为是三步反应^[19], 首先是氨基己二酸与 ATP 反应形成腺苷酸衍生物;第二步紧接着该腺苷酸衍生物在 NADPH 存在的条件下被还原;第三步, 被还原的腺苷酸衍生物裂解形成 α -氨基己二酸- δ -半醛。第一步的产物被成功的分离并鉴定, 即 δ -腺苷- α -氨基己二酸, 然而第二步的产物因为太不稳定而无法鉴定^[6]。

表 2 金针菇 L-赖氨酸合成途径中关键基因的亚细胞定位预测

Table 2 The subcellular localization of key genes in the L-lysine biosynthesis of *F. velutipes*

| 蛋白名称 Name | 氨基酸长度 Length | 线粒体转移肽 mTP | 信号肽 SP | 其它 Other | 定位 Location | 可信度值 RC |
|--------------|-----------------|---------------|-----------|-------------|----------------|------------|
| HCS | 464 | 0.180 | 0.062 | 0.822 | - | 2 |
| HAH | 703 | 0.829 | 0.046 | 0.150 | M | 2 |
| HIDH | 347 | 0.733 | 0.039 | 0.256 | M | 3 |
| AAT1 | 480 | 0.101 | 0.155 | 0.800 | - | 2 |
| AAT2 | 535 | 0.087 | 0.070 | 0.904 | - | 1 |
| AAR | 546 | 0.942 | 0.014 | 0.096 | M | 1 |
| SDR | 261 | 0.083 | 0.270 | 0.681 | - | 3 |
| SDH | 393 | 0.356 | 0.030 | 0.705 | - | 4 |

注：可信度值，包括从 1 到 5 五个级别，1 为可信度最高。

Note: RC, Reliability class, from 1 to 5, where 1 indicates the strongest prediction.

金针菇基因组中预测到 gene7226 编码氨基己二酸还原酶，一级结构特征如图 3 所示，序列全长 2 391 bp，包含 14 个内含子 15 个外显子，ORF 全长 1 641 bp 编码 546 个氨基酸，分子量为 57.96 kD，理论等电点 6.53。结构域分析显示该蛋白属于依赖于 NAD(P)⁺ 的醛脱氢酶超基因家族 (ALDH-SFsuperfamily 图 4F)，蛋白序列与 *C. torrendii* 的醛脱氢酶 (Accession No. K1Y68485) 相似性最高，达 79%；并且与双色蜡蘑 (*Laccaria bicolor*) 的醛脱氢酶 (Accession No. XP_001878717) 的相似性也高达 78%。二级结构显示 (图 4F)，该段序列具有较高的 α 螺旋 (47.84%) 和无规则卷曲 (39.68%)。亚细胞定位预测显示该蛋白定位于线粒体 (表 2)。

2.3.6 酵母氨酸还原酶和酵母氨酸脱氢酶：SDR 和 SDH 两者都是催化可逆反应，不同的 pH 值催化不同的反应。两者都受高浓度的 α -酮戊二酸和赖氨酸调控抑制^[20]。

值得注意的是，在金针菇的基因组测序报告中并没有预测到 SDR 基因，我们在分析 SDH 时，将其序列向上游延伸了 5 000 bp，意外发现附近的 SDR 基因。这两个基因同时位于 Scaffold-88，物理距离仅相差 111 bp，由此推测这两个基因在基因组

中位于同一个基因簇中，可能属于同一个遗传连锁群，其所代表的进化意义有待进一步深入研究。有报道称，SDR 和 SDH 在序列上并没有同源性，但是都具有真菌特异性，二者分别以 NADPH 和 NADH 作为辅酶，催化的反应非常类似^[6]。

经分析显示，SDR 序列全长 1 033 bp，包含 4 个内含子 5 个外显子 (图 3)，ORF 全长 786 bp，编码 261 个氨基酸，分子量为 27.43 kD，理论等电点是 5.35。结构域分析显示该蛋白属于 NADB-Rossmann 超家族 (图 4G)，这是一个包含脱氢酶和氧化还原酶的蛋白大家族。蛋白序列与 *C. torrendii* 的 SDR (Accession No. K1Y68484) 相似性最高，达 74%。二级结构 (图 4G) 显示，该段序列具有较高的 α -螺旋 (38.31%) 和无规则卷曲 (26.44%)。

SDH 序列全长 1 408 bp，包含 4 个内含子 5 个外显子，ORF 全长 1 182 bp，编码 393 个氨基酸，分子量为 42.91 kD，理论等电点是 5.27。结构域分析显示该蛋白亦属于 NADB-Rossmann 超家族 (图 4H)，蛋白序列与白环蘑菇 (*Leucoagaricus*) 的 SDH (Accession No. K1Y68484) 相似性最高，达 77%。二级结构显示 (图 4H)，该段序列具有较高的 α -螺旋 (29.26%) 和无规则卷曲 (36.13%)。

3 结论与讨论

本研究基于金针菇的全基因组序列，首次完整地报道了金针菇中 L-赖氨酸的从头合成途径，对该途径中的关键基因进行了理化性质研究以及生物信息学分析，确证了金针菇中 L-赖氨酸是通过 α -氨基己二酸途径形成，而非二氨基庚二酸途径。

α -氨基己二酸途径通常被认为分为两部分，前半部分是从 α -酮戊二酸开始到 α -氨基己二酸，后半部分是从 α -氨基己二酸到 L-赖氨酸。参与前半部分反应的 HCS、HAH 和 HIDH 三个酶在 *S. cerevisiae* 中均存在于线粒体中^[12]。在金针菇中，HAH 和 HIDH 也发现含有线粒体转移肽，但是金针菇 HCS 却没有预测到线粒体转移肽 (表 2)。 *S. cerevisiae* 的两个 AAT 一个存在于线粒体中，一个存在于胞质

中^[6], 而我们的结果显示金针菇中的两个 AAT 均存在于胞质中(表 2)。AAA 途径的后半部分反应通常认为是发生在胞质中 *S. cerevisiae* 中的 AAR、SDR、SDH 这 3 个酶也被证明是在胞质中发挥作用, 然而金针菇中的 AAR 酶亚细胞定位预测显示其定位于线粒体。推测这些差异可能是由于不同物种的赖氨酸合成途径在进化过程中产生了分离, 也有可能是由于全基因组测序后的基因注释的不完善, 下一步我们将会对这些基因进行克隆并进行功能验证, 确证其定位信息。

值得探讨的是, 我们的分析结果显示, 金针菇基因组中 SDR 和 SDH 两个基因位于同一个基因簇中, 物理位置非常相近, 可能属于同一个遗传连锁群; 而且有报道称, 这两个基因编码的蛋白酶催化的反应非常类似^[6]。目前尚未有关于二者在分子方面和进化方面的报道, 其所代表的进化意义有待我们进一步深入研究。

L-赖氨酸是人和动物的必需氨基酸, 只能从日常饮食中获取。本文分析了金针菇 α -氨基己二酸途径中的 8 个关键酶, 其中 HCS、HAH、SDR 和 SDH 受终产物赖氨酸的反馈抑制作用, 这些关键酶基因可作为提高赖氨酸含量的调节靶点, 通过利用赖氨酸结构类似物(AEC)筛选突变株或重组体^[21], 或者通过基因工程手段改良金针菇品种, 以获得高赖氨酸含量的新品种, 从而满足人们日常对赖氨酸的摄取, 为儿童生长发育提供重要营养来源, 将会有重大意义。

参 考 文 献

- [1] Yuan Z. *Flammulina velutipes* health function & processing use[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2005(6/7): 125-128 (in Chinese)
袁仲. 金针菇的保健功能与加工利用[J]. 农产品加工·学刊, 2005(6/7): 125-128
- [2] Sun YF, Sha CQ, Yu DS, et al. The study progress on functional proteins of *Flammulina velutipes*[J]. Journal of Microbiology, 2006, 26(4): 50-54 (in Chinese)
孙宇峰, 沙长青, 于德水, 等. 金针菇功能性蛋白的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(4): 50-54
- [3] Wang JY, Zhu SG, Xu CF. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 2002: 346-347 (in Chinese)
王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 346-347
- [4] Kosuge T, Hoshino T. Lysine is synthesized through the α -aminoadipate pathway in *Thermus thermophilus*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1998, 169(2): 361-367
- [5] Zabriskie TM, Jackson MD. Lysine biosynthesis and metabolism in fungi[J]. Natural Product Reports, 2000, 17(1): 85-97
- [6] Bhattacharjee JK. α -Aminoadipate pathway for the biosynthesis of lysine in lower eukaryotes[J]. CRC Critical Reviews in Microbiology, 1985, 12(2): 131-151
- [7] Liu F, Wang W, Chen BZ, et al. Homocitrate synthase expression and lysine content in fruiting body of different developmental stages in *Flammulina velutipes*[J]. Current Microbiology, 2015, 70(6): 821-828
- [8] Kanehisa M, Araki M, Goto S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(S1): D480-D484
- [9] Solovyev V, Kosarev P, Seledsov I, et al. Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters[J]. Genome Biology, 2006, 7(S1): S10.1-S10.12
- [10] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server[A]//Walker JM. The Proteomics Protocols Handbook[M]. Totowa: Humana Press, 2005: 571-607
- [11] Geourjon C, Del é age G. SOPM: a self-optimized method for protein secondary structure prediction[J]. Protein Engineering, 1994, 7(2): 157-164
- [12] Xu HY, Andi B, Qian JH, et al. The α -aminoadipate pathway for lysine biosynthesis in fungi[J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2006, 46(1): 43-64
- [13] Ehmann DE, Gehring AM, Walsh CT. Lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of α -Aminoadipate reductase (Lys2) involves posttranslational phosphopantetheinylation by Lys5[J]. Biochemistry, 1999, 38(19): 6171-6177
- [14] Hogg RW, Broquist HP. Homocitrate formation in *Neurospora crassa*. Relation to lysine biosynthesis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1968, 243(8): 1839-1845
- [15] Gabriel I, Kur K, Laforce-Nesbitt SS, et al. Phenotypic consequences of *LYS4* gene disruption in *Candida albicans*[J]. Yeast, 2014, 31(8): 299-308
- [16] Fazius F, Shelest E, Gebhardt P, et al. The fungal α -aminoadipate pathway for lysine biosynthesis requires two enzymes of the aconitase family for the isomerization of homocitrate to homoisocitrate[J]. Molecular Microbiology, 2012, 86(6): 1508-1530
- [17] Matsuda M, Ogur M. Separation and specificity of the yeast glutamate- α -ketoadipate transaminase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1969, 244: 3352-3358
- [18] Nishida H, Nishiyama M. What is characteristic of fungal lysine synthesis through the α -aminoadipate pathway?[J]. Journal of Molecular Evolution, 2000, 51(3): 299-302
- [19] Sagisaka S, Shimura K. Studies in lysine biosynthesis. IV. Mechanism of activation and reduction of α -aminoadipic acid[J]. Journal of Biochemistry, 1962, 52: 155-161
- [20] Schomburg D, Schomburg I, Chang A. Springer Handbook of Enzymes Volume 23[M]. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005: 78-107
- [21] Zheng YB, Xie BG, Lin XJ, et al. Effect of AEC on the mycelial growth and oidium germination of *Flammulina velutipes*[J]. Acta Edulis Fungi, 2004, 11(3): 7-11 (in Chinese)
郑永标, 谢宝贵, 林新坚, 等. AEC对金针菇菌丝生长和粉孢子萌发的抑制作用[J]. 食用菌学报, 2004, 11(3): 7-11