

研究报告

## 粗糙脉孢菌丝氨酸/苏氨酸激酶家族基因敲除库纤维素酶表达分泌研究

王珊珊<sup>1,2</sup> 林良才<sup>2</sup> 贾士儒<sup>1</sup> 田朝光<sup>2\*</sup>

(1. 天津科技大学生物工程学院 天津 300457)

(2. 中国科学院天津工业生物技术研究所 天津 300308)

**摘要:**【目的】蛋白磷酸化在丝状真菌细胞对外界纤维素酶诱导信号感应以及信号胞内的传导过程中有着重要的作用,而蛋白磷酸化是由蛋白激酶来完成的。为了挖掘在丝状真菌纤维素酶表达过程中发挥重要作用的激酶基因,对粗糙脉孢菌丝氨酸/苏氨酸家族的61株蛋白激酶单基因突变体的纤维素酶表达分泌情况进行了分析测定。【方法】在以微晶纤维素为唯一碳源条件下,7株单基因突变体胞外分泌蛋白产量有显著变化,随后,对这7株突变体胞外蛋白进行了详细的SDS-PAGE分析和内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶酶活、 $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活、外切纤维素酶酶活以及木聚糖酶酶活的测定。【结果】突变株W14、W38、W87和W40胞外分泌蛋白含量提高了30%以上,除了突变株W14外,其它突变体的内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶酶活分别显著提高了62%、42%和42%。而突变株W85、W26和W46胞外分泌蛋白含量降低了50%以上,相对应的内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶酶活也分别下降了86%、75%和84%。【结论】这些关于粗糙脉孢菌丝氨酸/苏氨酸家族蛋白激酶基因的挖掘,为进一步深入研究蛋白激酶在纤维素酶诱导表达调控中的分子机理奠定了基础。

**关键词:** 纤维素酶表达, 信号传导, 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 粗糙脉孢菌

## Cellulase expression analysis of serine/threonine kinase gene deletion mutants of *Neurospora crassa*

WANG Shan-Shan<sup>1,2</sup> LIN Liang-Cai<sup>2</sup> JIA Shi-Ru<sup>1</sup> TIAN Chao-Guang<sup>2\*</sup>

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

(2. Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

**Abstract:** [Objective] Protein phosphorylation plays an important role in many important cellular processes, such as the extracellular cellulase induction signal sensing and intracellular signal transduction processes in filamentous fungi. The protein phosphorylation is controlled by protein

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31501007, 31471186); Tianjin Zhuanxiang (No. 11ZCZDSY08900)

\*Corresponding author: Tel: 86-22-84861947; E-mail: tian\_cg@tib.cas.cn

Received: September 29, 2016; Accepted: December 21, 2016; Published online (www.cnki.net): December 27, 2016  
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31501007, 31471186); 天津专项(No. 11ZCZDSY08900)

\*通讯作者: Tel: 86-22-84861947; E-mail: tian\_cg@tib.cas.cn

收稿日期: 2016-09-29; 接受日期: 2016-12-21; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-12-27

kinases. **[Methods]** To discover the roles of protein kinases in cellulase induction signaling pathway, we analyzed cellulase expression levels of 61 kinase mutants using 2% crystalline cellulose as the sole carbon source. Compared with the wild type, cellulase productions in 7 mutants were significantly changed. Then, we did the SDS-PAGE analysis and measured the endo-beta-1,4-glucanase activity, beta-glucosidase activity, cellobiohydrolase activity, xylansae activity of these 7 mutants. **[Results]** We found that extracellular proteins of mutants W14, W38, W87 and W40 increased more than 30%, and their endo-beta-1,4-glucanase activities increased by 62%, 42% and 42% respectively, except for mutant W14. Moreover, the extracellular proteins of mutants W85, W26 and W46 decreased over 50%, and their endo-beta-1,4-glucanase activities were also reduced by 86%, 75% and 84% respectively. **[Conclusion]** These observations about serine/threonine protein kinase genes in *Neurospora crassa* could be helpful to better understand the roles of protein kinases in cellulase induction pathway.

**Keywords:** Cellulase expression, Signal induction, Serine/threonine protein kinases, *Neurospora crassa*

随着化石资源的过度索取以及环境压力的日益凸显, 加快对绿色可再生资源的开发利用已迫在眉睫。因此, 利用丰富而廉价的生物质原料来生产生物基化学品和生物燃料成了近年来研究的热点<sup>[1]</sup>。但是, 生物质原料的结构十分复杂, 聚合度很高, 这就决定了它难以降解的特性, 其降解需要一系列的纤维素降解酶来协同完成。然而, 较高的纤维素酶生产成本严重制约了生物炼制产业的发展<sup>[2]</sup>。

丝状真菌纤维素酶的表达受到信号感应、传导和转录调控共同作用。目前, 国内外众多学者对纤维素酶表达调控分子机制方面进行了大量的研究, 鉴定了纤维素酶表达调控因子, 如 Cre1、Ace1、Ace2、CLR-1 和 CLR-2<sup>[3-6]</sup>等, 较为清晰地解析了纤维素酶表达调控网络中的关键元件及其相互之间的关系。在纤维素酶诱导信号传递方面, 通过组合敲除粗糙脉孢菌主要的  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 构建了稳定的纤维二糖诱导表达纤维素酶体系<sup>[7]</sup>, 使得丝状真菌纤维素酶诱导表达的分子机理研究进入到了分子遗传学水平。后续的研究表明  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因和纤维二糖转运蛋白都参与到了纤维二糖诱导表达纤维素酶信号传导过程中, 并在其中发挥重要的作用<sup>[8]</sup>。尽管纤维素酶诱导表达信号传导途径取得了显著的进展, 但由于整个途径非常复杂, 克隆鉴定整个信号通路中其他基因元件仍是阐明纤维

素酶信号传导途径分子基础的关键。

蛋白磷酸化在微生物信号传导、代谢、昼夜节律等生理生化过程中扮演着极其重要的角色, 蛋白磷酸化是由蛋白激酶来调控的。蛋白激酶能够特异性催化丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸发生磷酸化<sup>[9-11]</sup>, 进而把信号分子由胞外传递到胞内, 再通过影响下游基因转录或蛋白修饰从而实现生物体多种多样的生物学功能。纤维素酶的表达受到细胞内 cAMP 浓度的影响, cAMP 通过激活 PKA 来对下游的靶基因进行调控, 从而进一步影响纤维素酶的表达。例如: cAMP 浓度升高会使得 PKA 活性升高, 进而导致纤维素酶活性升高<sup>[12-13]</sup>。此外, MAPK 信号传导途径也参与到纤维素酶的表达调控中<sup>[14]</sup>。在里氏木霉中, 已经证明 MAPK 信号传导途径中蛋白激酶 *Tmk2* 和 *Tmk3* 与纤维素酶的表达调控有关, 其中蛋白激酶 *Tmk3* 有利于纤维素酶的表达, 而蛋白激酶 *Tmk2* 抑制纤维素酶的表达<sup>[15-16]</sup>。除此之外, 蛋白激酶 *TrIme2*、*TrSch9* 和 *Tryak1* 都参与纤维素酶的表达, 其中敲除 *TrIme2* 或 *Tryak1* 可以显著提高纤维素酶的表达水平, 而敲除 *TrSch9* 会导致纤维素酶表达缺陷<sup>[17-18]</sup>。这些都说明蛋白激酶与纤维素酶基因的表达调控具有紧密的联系。

作为天然木质纤维素快速降解真菌, 粗糙脉孢菌不但具有简便成熟的遗传操作系统, 同时还具有

全基因范围基因敲除突变体库和丰富的生物信息学数据, 这些都为丝状真菌纤维素酶表达调控机理的研究提供了极大的便利<sup>[19-20]</sup>。目前, 在真核生物中, 已经证明丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶在调节细胞生理过程中发挥重要作用<sup>[11]</sup>, 但关于该家族基因在纤维素酶表达调控中的作用却鲜有报道。在粗糙脉孢菌中共有 107 个丝氨酸/苏氨酸家族蛋白激酶<sup>[11]</sup>, 对本实验室购买的单基因突变体库进行分析, 发现库中有 61 个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶基因有纯合突变体, 我们就以这 61 株突变体为基础, 系统分析测定了它们的纤维素酶分泌水平, 包括摇瓶发酵液的蛋白浓度和主要纤维素酶的酶活, 初步了解了蛋白激酶家族基因对纤维素酶表达分泌的影响。其中敲除基因 W14、W38、W87 和 W40 后, 菌株纤维素酶表达分泌水平显著提高, 而敲除基因 W85、W26 和 W46 后, 极大降低了粗糙脉孢菌纤维素酶表达分泌。本研究为进一步深入解析丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族基因在纤维素酶表达分泌中的分子作用奠定了坚实基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

实验所用粗糙脉孢菌野生型菌株 FGSC2489 和粗糙脉孢菌丝氨酸/苏氨酸家族蛋白激酶单基因突变体均是从美国真菌遗传保藏中心(Fungal Genetics Stock Center, FGSC)购买的。

### 1.2 主要试剂和仪器

对硝基苯纤维二糖苷 p-NPC、对硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷 p-NPG、Azo-CM-Cellulose 和 Azo-CM-Xylan, Megazyme 公司; 微晶纤维素 Avicel PH 101 和其他常用生化试剂, Sigma-Aldrich 公司。NanoDrop 微量定量仪, Thermo Scientific 公司; 蛋白电泳仪, Bio-Rad 公司; 电子分析天平, Sartorius 公司; 恒温水浴锅, 上海一恒科技有限公司。

### 1.3 培养基

基本培养基(Minimal Media, MM) (g/L): 50×Vogel's 盐 20.0 mL<sup>[7]</sup>, 蔗糖 20.0, 固体培养基则

另外加琼脂粉 15.0。

产酶培养基(g/L): 50×Vogel's 盐 20.0 mL、微晶纤维素 20.0。

生长培养基(g/L): 50×Vogel's 盐 20.0 mL、葡萄糖 20.0。

### 1.4 摇瓶发酵实验

将菌株接种至 MM 斜面上, 28 °C 培养箱暗培养 2 d 左右后, 将其移至 28 °C 光照培养 10 d 左右, 用 0.05%吐温 80 将孢子洗下来, 并用 3 层拭镜滤纸过滤。将过滤收集的孢子用血球计数板进行计数后, 按照 10<sup>5</sup> 个/mL 接种到产酶培养基中, 25 °C、200 r/min 摇床光照培养 6 d。

### 1.5 蛋白浓度的测定

蛋白浓度的测定方法采用 Bradford 法进行测定, 从发酵摇瓶中取出一定的发酵液, 室温下 12 000 r/min 离心 10 min 后把上清取出来放在 1.5 mL EP 管中, 取 20 μL 上清于 1 mL Bradford 溶液中, 混匀, 室温放置 5 min 后测其 OD<sub>595</sub>, 以牛血清蛋白标准蛋白液绘制标准曲线。每个样品做 3 个平行, 取其平均值即为其蛋白浓度值。

### 1.6 酶活的测定

**1.6.1 内切-β-1,4-葡聚糖酶酶活的测定方法:** 将发酵液上清用 0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液(pH 4.6)稀释到合适的浓度, 然后取 200 μL 稀释好的发酵液上清, 同时取 200 μL Azo-CM-Cellulose 底物酶液放在 40 °C 水浴锅中预热 5 min 后将两者混匀, 然后置于 40 °C 水浴锅中反应 10 min; 取出后迅速加入 1 mL 沉淀剂终止反应, 混匀后室温静置 10 min; 1 000×g 离心 10 min, 测定 OD<sub>590</sub> 值。空白组使用灭活酶液作为对照。每个样品做 3 个平行对照。根据公式计算内切-β-1,4-葡聚糖酶活力(U/mL): Units/mL = (412.5×Abs-6.0)×2×Dilution/1 000。

**1.6.2 木聚糖酶酶活的测定方法:** 将发酵液上清用 0.1 mol/L、pH 4.6 醋酸钠缓冲液稀释到合适的浓度, 取 200 μL 稀释好的发酵液上清, 同时取 200 μL Azo-CM-Xylan 底物酶液放在 45 °C 水浴锅中预热 5 min 后将两者混匀, 然后置于 45 °C 水浴锅中反应

10 min;反应结束后取出迅速加入 1 mL 沉淀剂终止反应,混匀后室温静置 10 min;1 500×g 离心 10 min,测定  $OD_{590}$  值。空白组使用灭活酶液作为对照。每个样品做 3 个平行对照。根据公式计算内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶活力 (U/mL) :  $\text{Units/mL} = (412.5 \times \text{Abs} - 6.0) \times 2 \times \text{Dilution} / 1\ 000$ 。

**1.6.3  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的测定方法:**将发酵液上清用 0.05 mol/L、pH 4.8 柠檬酸钠缓冲液稀释到合适的浓度,取 250  $\mu$ L 稀释好的发酵液上清,同时取 250  $\mu$ L 对硝基苯葡萄糖苷 (p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside, pNPG, 1 g/L)底物酶液放在 50 °C 水浴锅中预热 5 min 后将两者混匀,然后置于 50 °C 水浴锅中反应 10 min;取出后迅速加入 500  $\mu$ L 浓度为 1 mol/L 的碳酸钠溶液来终止反应,混匀后冰上反应 5 min;测定  $OD_{420}$  值。空白组使用灭活酶液作为对照。每个样品做 3 个平行对照。根据公式计算  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力 (U/mL) :  $\text{Units/mL} = \text{Abs} \times 0.25 \times 4 \times \text{Dilution} / 10\ 000$ 。

**1.6.4 外切纤维素酶活性的测定方法:**将发酵液上清用 0.05 mol/L、pH 4.8 柠檬酸钠缓冲液稀释到合适的浓度,取 250  $\mu$ L 稀释好的发酵液上清,同时取 250  $\mu$ L 对硝基苯纤维二糖苷 (p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-cellubioside, pNPC, 1 g/L)底物和酶液放在 50 °C 水浴锅中预热 5 min 后将两者混匀,然后置于 50 °C 水浴锅中反应 10 min;取出后迅速加入 500  $\mu$ L 浓度为 1 mol/L 的碳酸钠溶液来终止反应,混匀后冰上反应 5 min;测定  $OD_{420}$  值。空白组使用灭活酶液作为对照。每个样品做 3 个平行对照。根据公式计算外切纤维素酶活力 (U/mL) :  $\text{Units/mL} = \text{Abs} \times 0.25 \times 4 \times \text{Dilution} / 10\ 000$ 。

## 1.7 菌丝干重的测定

**1.7.1 在以 2%葡萄糖为底物的培养基上菌丝干重的测定:**将在 2%葡萄糖上摇瓶发酵 2 d 的菌丝培养物,使用抽滤瓶进行抽滤,然后放到已经称重的锡箔纸( $W_0$ )上,包好后放到 80 °C 烘箱中烘干,待其恒重后用分析天平称其重量为  $W_1$ ,每个样品做 3 个平行,取平均值。菌丝干重= $W_1 - W_0$ 。

**1.7.2 在以 2%微晶纤维素为底物的培养基上菌丝干重的测定:**取在 2% Avicel 上摇瓶发酵 6 d 的发酵液 3 mL 置于已称重为  $W_0$  的 15 mL 离心管中,室温下 1 200 r/min 离心 10 min 去上清,80 °C 烘箱烘干后称其重量为  $W_1$ ,取硝酸醋酸混合液 3 mL 加入离心管中,连续煮沸 2 h 裂解菌丝体,离心去除上清,再加入 3 mL 水,振荡均匀后,离心去上清,重复一次,置于 80 °C 烘箱中烘干后称其重量为  $W_2$ ,每个样品做 3 个平行,取平均值。菌丝干重= $(W_1 - W_2) \times 1\ 000 / 3$ 。

## 1.8 产孢能力的测定

取野生型菌株和 7 株突变株孢子浓度为  $10^6$  个/mL 的孢子悬液 5  $\mu$ L,接种到含有 2%的葡萄糖斜面上,28 °C 培养箱暗培养 2 d 后,将其移至 28 °C 光照培养 10 d,用 0.05%吐温 80 将孢子洗下来,用血球计数板进行计数,每个菌株做 3 个平行对照,取平均数即可。

## 2 结果与分析

### 2.1 丝氨酸/苏氨酸激酶家族基因敲除库纤维素酶表达分泌分析

粗糙脉孢菌作为天然的木质纤维素降解真菌,具有很强的纤维素降解能力,在以纤维素为唯一碳源的情况下可以分泌大量胞外蛋白,其中纤维素酶占到了胞外总蛋白的 50%以上<sup>[21]</sup>。研究显示,粗糙脉孢菌是研究丝状真菌纤维素酶表达调控机理的良好模型<sup>[22]</sup>。因此,为了挖掘丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶在丝状真菌纤维素酶表达中的作用,我们将本实验室已有的 61 株丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶单基因突变体在以微晶纤维素为唯一碳源的条件下摇瓶发酵 6 d,以野生型菌株作为对照,考察其发酵液上清的蛋白浓度。结果显示,与野生型菌株相比,敲除基因 W14、W38、W87 和 W40 后,菌株纤维素酶表达分泌水平显著提高,敲除基因 W85、W26 和 W46 后,菌株纤维素酶表达分泌水平显著降低(图 1)。从图 1 中可以看出这些基因很可能在纤维素酶表达过程中扮演着重要角色,因此,将它们作为后续的研究对象。

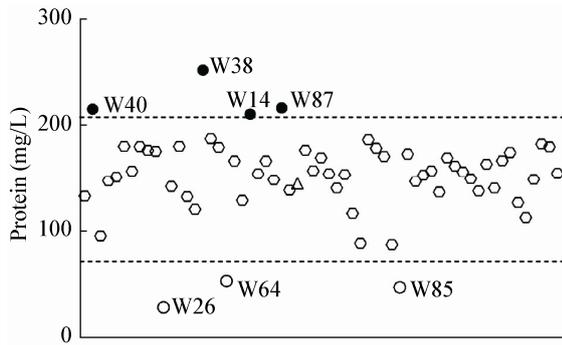


图1 丝氨酸/苏氨酸家族61株蛋白激酶突变体蛋白含量分布图

**Figure 1 The distribution of protein concentration of 61 serine/threonine kinase mutants**

注: 摇瓶发酵条件为: 2%微晶纤维素培养基, 25 °C、200 r/min 摇床光照培养 6 d; 空心圆圈表示低蛋白突变体; 实心圆圈表示高蛋白突变体; 六边形表示蛋白没有显著变化的突变体; 三角形表示野生型菌株。

Note: The strains were cultured at 25 °C, 200 r/min in the light for 6 d on 2% Avicel; Open circles: Hyposcretion; Filled circles: Hypersecretion; Open hexagons: No change; Open triangle: WT strain.

**2.2 激酶突变体的进一步分析以及 SDS-PAGE 分析**

将 2.1 得到的这些纤维素酶表达分泌水平显著变化的 7 株突变株进一步进行分析, 结果如图 2 所示, 缺失基因 W14、W38、W87 和 W40 的突变株蛋白含量分别提高了 31%、51%、30%和 40%, 其中缺失基因 W38 蛋白产量提高的最为显著, 而缺失基因 W85、W26 和 W46 的突变株蛋白含量分别降低了 69%、50%和 53%, 其中缺失基因 W85 分泌的胞外蛋白仅为野生型菌株的 30%。这些都与 2.1 中的分析结果相吻合。

根据文献报道, 粗糙脉孢菌在以微晶纤维素为唯一碳源的情况下可以分泌大量胞外蛋白, 其中主要的纤维素酶组分 CBH-1 (NCU07340)、GH6-2 (NCU09680)、GH5-1 (NCU00762)和 GH3-4 (NCU04952)占到胞外分泌蛋白总量的 65%<sup>[23-25]</sup>。为了进一步确定上述突变体胞外蛋白浓度的变化是由于纤维素酶表达变化所引起的, 我们对这

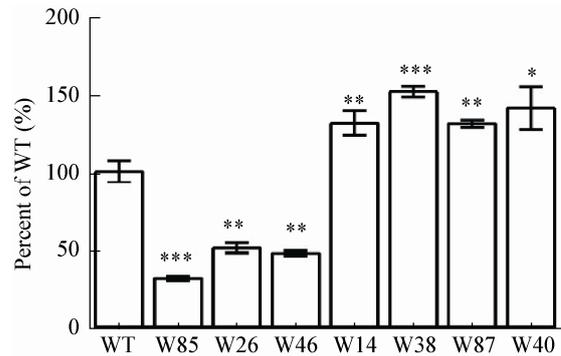


图2 突变体相对于野生型的蛋白分泌量

**Figure 2 Percentages of secreted protein in serine/threonine kinase mutants relative to the WT**

注: 摇瓶发酵条件为: 2%微晶纤维素培养基, 25 °C、200 r/min 摇床光照培养 6 d; \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ .

Note: The strains were cultured at 25 °C, 200 r/min in the light for 6 d on 2% Avicel; \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ .

7 株突变株的发酵液上清进行了 SDS-PAGE 分析。如图 3 所示, 与野生型菌株相比, 突变株 W85、W26 和 W46 的蛋白条带显著变弱, 而 W14、W38、W87 和 W40 蛋白条带显著加深, 尤其是在 72 kD 处的 CBH-1 和 GH6-2。这些结果也进一步证明了这些激酶参与到纤维素酶表达分泌的过程中。

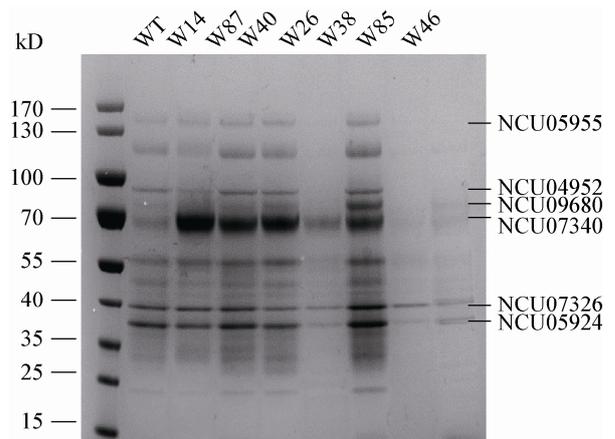


图3 野生型和突变株的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

**Figure 3 SDS-PAGE analysis of total secreted protein**

## 2.3 突变株酶活力的测定

**2.3.1 突变株的内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶酶活力的测定:**按照 1.6.1 中所描述的内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶酶活力的测定方法,将摇瓶培养 6 d 后离心的发酵液上清稀释至合适的浓度后进行酶活力的测定。如图 4 所示,缺失基因 W85、W26 和 W46 会引起内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶酶活显著下降,其活性分别下降了 86%、75%和 84%,而缺失基因 W38、W87、W40 内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶酶活会显著提高,分别提高了 62%、42%和 42%。值得注意的是,缺失基因 W14,其内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶酶活并没有明显性变化。

**2.3.2 突变株的  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活力的测定:**按照 1.6.3 中所描述的  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活力的测定方法,将摇瓶培养 6 d 后离心的发酵液上清稀释至合适的浓度后进行酶活力的测定。如图 5 所示,缺失基因 W85、W26、W46 和 W14 导致  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性显著下降,分别下降了 98%、91%、82%和 55%,而缺失基因 W38、W87 和 W40 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性与野生型相比没有显著性差异。NCU04952 是粗糙脉孢菌最主要的胞外  $\beta$ -葡萄糖苷酶,SDS-PAGE 分析显示,突变体 W38、W87 和 W40 的胞外  $\beta$ -葡萄糖苷酶条带与野生型菌株无显著差异,而突变体 W85、W26、W46 和 W14 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶条带明显减弱(图 3),这些都与酶活结果相吻合。

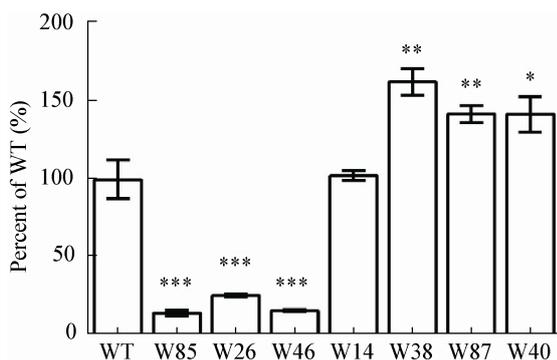


图 4 突变体相对于野生型的内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶酶活力

**Figure 4 Relative CMCase activity of WT and mutants**

注:取在 2%微晶纤维素培养基上 25 °C、200 r/min 光照摇瓶培养 6 d 的发酵液上清测定酶活; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

Note: The activity in supernatants from mutants were cultured at 25 °C, 200 r/min in the light for 6 d on 2% Avicel; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

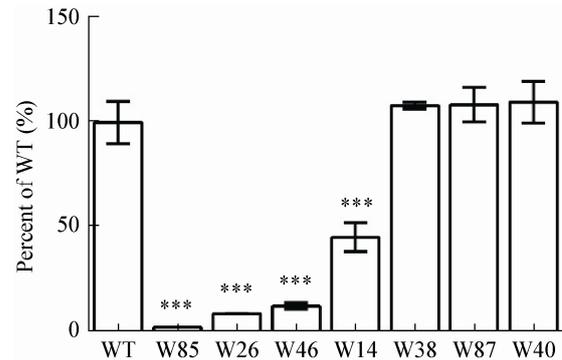


图 5 突变体相对于野生型的  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活力

**Figure 5 beta-Glucosidase activity of WT and mutants**

注:取在 2%微晶纤维素培养基上 25 °C、200 r/min 光照摇瓶培养 6 d 的发酵液上清测定酶活; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

Note: The activity in supernatants from mutants were cultured at 25 °C, 200 r/min in the light for 6 d on 2% Avicel; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

**2.3.3 突变株的外切纤维素酶酶活力的测定:**按照 1.6.4 中所描述的外切纤维素酶酶活力的测定方法,将摇瓶培养 6 d 后离心的发酵液上清稀释至合适的浓度后进行酶活力的测定。外切纤维素酶能够从小分子的纤维素非还原性末端进行水解,每次能够切下一个纤维二糖分子。如图 6 所示,缺失基因 W85、W26、W46 和 W14 会引起外切纤维素酶活性显著下降,分别下降了 80%、60%、69%和 34%,而缺失基因 W87 和 W40 外切纤维素酶活性略有提高,分别提高了 25%和 33%。其中,值得注意的是缺失基因 W38 外切纤维素酶没有发生显著性变化。

**2.3.4 突变株的木聚糖酶酶活力的测定:**粗糙脉孢菌在以微晶纤维素为唯一碳源的情况下,不仅能表达分泌大量纤维素酶,同时还可以分泌多种半纤维素酶,如 NCU05924 (Endo-xylanase)、NCU07326 (Putative arabinase)和 NCU05995 (GH74)。按照 1.6.2 中所描述的木聚糖酶酶活力的测定方法,将摇瓶培养 6 d 后离心的发酵液上清稀释至合适的浓度后进行酶活力的测定。如图 7 所示,缺失基因 W85、W26、W46 和 W14 的突变株木聚糖酶活性显著下

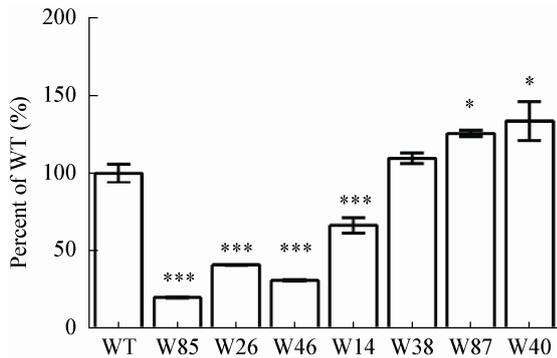


图6 突变体相对于野生型的外切纤维素酶酶活力

Figure 6 pNPC activity of WT and mutants

注: 取在 2%微晶纤维素培养基上 25 °C, 200 r/min 光照摇瓶培养 6 d 的发酵液上清测定酶活; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

Note: The activity in supernatants from mutants were cultured at 25 °C, 200 r/min in the light for 6 d on 2% Avicel; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

降, 分别下降了 91%、81%、77%和 39%。同时, SDS-PAGE 也显示突变株 W85、W26 和 W46 的半纤维素酶条带与野生型菌株相比 3 个半纤维素酶条带(NCU05924、NCU07326 和 NCU05995)明显减弱, 这与酶活结果相一致。此外, 缺失基因 W38、W87 和 W40 的突变株木聚糖酶活性显著提高, 分别提高了 87%、33%和 48%。尤其是突变株 W38 所分泌的半纤维素酶 NCU05924 和 NCU07326 条带显著加深。

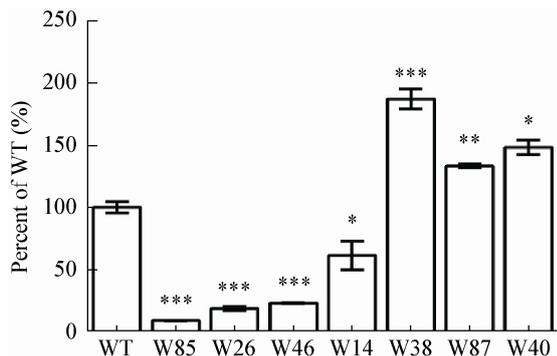


图7 突变体相对于野生型的木聚糖酶酶活力

Figure 7 Xylanase activity of WT and mutants

注: 取在 2%微晶纤维素培养基上 25 °C, 200 r/min 光照摇瓶培养 6 d 的发酵液上清测定酶活; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

Note: The activity in supernatants from mutants were cultured at 25 °C, 200 r/min in the light for 6 d on 2% Avicel; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

## 2.4 突变株生物量的测定

考察了 7 株突变体在以葡萄糖为碳源条件下的生长情况。结果显示, 除了突变株 W85 之外, 其余突变株的产孢和生物量积累都与野生型菌株相比无显著性差异(图 8)。同时, 还对这些突变株在以纤维素为唯一碳源条件下培养 6 d 的生物量进行了测定。结果显示, 缺失基因 W26、W85 和 W46 的产酶缺陷菌株所积累的生物量分别下降了 26%、57%和 48%, 而其余突变体与野生型菌株无显著差异(图 9)。由此可知, 这些突变体纤维素酶产量显著降低不是由自身的生长缺陷所引起的, 而是这些纤维素酶表达过程中关键元件的缺失所导致的。

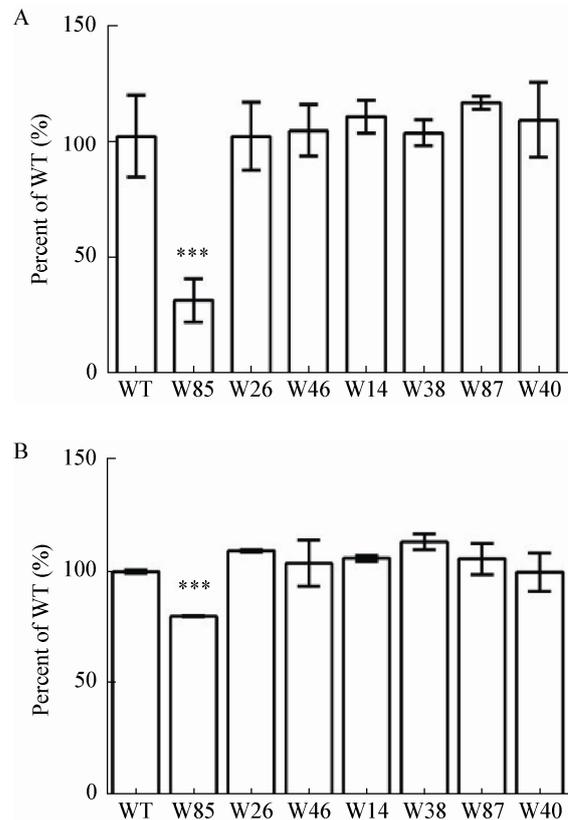


图8 突变体和野生型菌株在葡萄糖条件下的生长情况

Figure 8 Growth of WT and mutants when grown on glucose

注: A: 在含有 2%葡萄糖的斜面上的产孢情况; B: 在含有 2%葡萄糖的液体培养基中摇瓶生长 2 d 的生物量; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

Note: A: The conidial yields when grown on 2% glucose agar; B: The dry weights when grown on 2% glucose medium; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

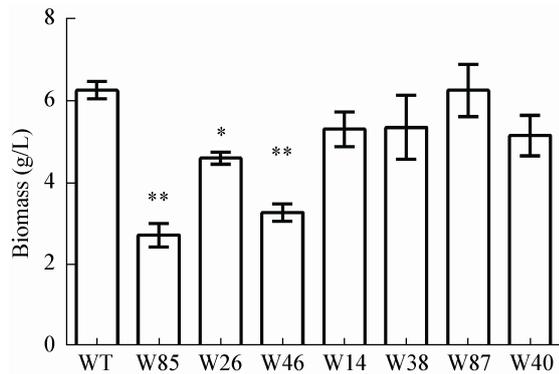


图9 突变体和野生型菌株在纤维素条件下的生物量  
Figure 9 Biomass comparison between WT and mutants when grown on Avicel

注: 2%微晶纤维素液体培养基, 25 °C, 200 r/min 摇床光照培养 6 d 的生物量; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

Note: The mutants were cultured at 25 °C, 200 r/min in the light for 6 d on 2% Avicel; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

### 3 讨论

丝状真菌纤维素酶表达受到胞外信号和胞内转录调控因子的共同作用。近年来, 纤维素酶转录调控机理已取得了显著的研究成果, 尤其是在调控元件的挖掘、功能鉴定和各个元件间相互作用的分子机制等方面<sup>[26]</sup>。然而, 对于纤维素酶表达过程中信号传导途径的解析却鲜有报道, 仅有的一些研究也都主要集中在 cAMP 途径和 MPKA 途径。因此, 亟需挖掘、鉴定纤维素酶信号传导途径中重要元件, 从而进一步科学阐释丝状真菌对纤维素酶诱导

物的感应以及胞内的信号传递这一复杂过程。

与其它纤维素降解丝状真菌相比, 粗糙脉孢菌具有全基因组单基因敲除突变体库这一优势资源, 这使得全面、系统地研究、筛选与纤维素酶信号传递途径相关的基因成为了可能。本研究通过对 61 株粗糙脉孢菌丝氨酸/苏氨酸家族蛋白激酶突变体在纤维素条件下纤维素酶表达分泌的系统分析, 发现缺失基因 W14、W38、W87 和 W40 时, 菌株胞外分泌蛋白含量显著提高, 缺失基因 W26、W58 和 W46 时, 菌株胞外分泌的蛋白水平大幅降低。突变株的分泌蛋白和酶活分析显示, 大多数突变体的胞外蛋白水平的变化与纤维素酶活水平的变化一致。值得注意的是, 缺失基因 W14 的突变株胞外蛋白产量大约提高了 30%, SDS-PAGE 分析显示其主要纤维素酶 CBH I 和 CBH II 位置蛋白条带显著加深, 然而其内切纤维素酶酶活与野生型相比无明显差异, 而且外切纤维素酶酶活、 $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活和半纤维素酶酶活均出现了不同程度地降低。由此推测, 缺失该基因也许影响正常的蛋白翻译后修饰或蛋白筛选分泌过程, 从而将非正常修饰或折叠蛋白分泌到胞外。该基因在纤维素酶表达过程中的分子功能有待进一步深入研究。此外, 通过蛋白序列同源性分析可知这些基因在纤维素降解真菌中具有很高的保守性, 相似性都达到了 50% 以上, 其中基因 W38 在里氏木霉中相似基因的相似性高达 86% (表 1)。

表 1 突变株基因在其它丝状真菌中同源性分析  
Table 1 Homology analysis of the protein sequences of target genes from *Neurospora crassa*, *Trichoderma reesei* and *Myceliophthora thermophila*

粗糙脉孢菌 <i>Neurospora crassa</i>	里氏木霉同源基因相似性 The identities of <i>Trichoderma reesei</i> (%)	嗜热毁丝霉同源基因相似性 The identities of <i>Myceliophthora thermophila</i> (%)
W46	62	72
W87	59	76
W14	58	60
W40	55	51
W26	61	53
W38	86	62
W85	79	64

这暗示着这些基因在丝状真菌中的功能具有很高的保守性。因此, 这些新元件的筛选将有利于纤维素酶诱导表达信号传导通路这一重要生命过程的分子机理早日得到全面阐释, 并对纤维素酶高产菌株构建和生物质利用转化都有着重要的科学意义和应用价值。

## 参考文献

- [1] Dogaris I, Mamma D, Kekos D. Biotechnological production of ethanol from renewable resources by *Neurospora crassa*: an alternative to conventional yeast fermentations?[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(4): 1457-1473
- [2] Garvey M, Klose H, Fischer R, et al. Cellulases for biomass degradation: comparing recombinant cellulase expression platforms[J]. Trends in Biotechnology, 2013, 31(10): 581-593
- [3] Nakari-Setälä T, Paloheimo M, Kallio J, et al. Genetic modification of carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* for improved protein production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(14): 4853-4860
- [4] Aro N, Ilmén M, Saloheimo A, et al. ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 56-65
- [5] Aro N, Saloheimo A, Ilmén M, et al. ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(26): 24309-24314
- [6] Coradetti ST, Xiong Y, Glass NL. Analysis of a conserved cellulase transcriptional regulator reveals inducer-independent production of cellulolytic enzymes in *Neurospora crassa*[J]. Microbiology Open, 2013, 2(4): 595-609
- [7] Znameroski EA, Coradetti ST, Roche CM, et al. Induction of lignocellulose-degrading enzymes in *Neurospora crassa* by celldextrins[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(16): 6012-6017
- [8] Znameroski EA, Li X, Tsai JC, et al. Evidence for transceptor function of celldextrin transporters in *Neurospora crassa*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(5): 2610-2619
- [9] Dickman MB, Yarden O. Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi[J]. Fungal Genetics and Biology, 1999, 26(2): 99-117
- [10] Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification[J]. The FASEB Journal, 1995, 9(8): 576-596
- [11] Park G, Servin JA, Turner GE, et al. Global analysis of serine-threonine protein kinase genes in *Neurospora crassa*[J]. Eukaryotic Cell, 2011, 10(11): 1553-1564
- [12] D'Souza CA, Heitman J. Conserved cAMP signaling cascades regulate fungal development and virulence[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2001, 25(3): 349-364
- [13] Griffioen G, Thevelein JM. Molecular mechanisms controlling the localisation of protein kinase A[J]. Current Genetics, 2002, 41(4): 199-207
- [14] Hamel LP, Nicole MC, Duplessis S, et al. Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: distinct messages from conserved messengers[J]. The Plant Cell, 2012, 24(4): 1327-1351
- [15] Wang MY, Zhao QS, Yang JH, et al. 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
- [16] Wang MY, Dong YM, Zhao QS, et al. Identification of the role of a MAP kinase Tmk2 in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*)[J]. Scientific Reports, 2014, 4: 6732
- [17] Chen F, Chen XZ, Su XY, et al. An Ime2-like mitogen-activated protein kinase is involved in cellulase expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*[J]. Biotechnology Letters, 2015, 37(10): 2055-2062
- [18] Lü XX, Zhang WX, Chen GJ, et al. *Trichoderma reesei* Sch9 and Yak1 regulate vegetative growth, conidiation, and stress response and induced cellulase production[J]. Journal of Microbiology, 2015, 53(4): 236-242
- [19] Beadle GW, Tatum EL. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1941, 27(11): 499-506
- [20] Perlman D. Observations on the production of ethanol by fungi and yeasts[J]. American Journal of Botany, 1950, 37(3): 237-241
- [21] Coradetti ST, Craig JP, Xiong Y, et al. Conserved and essential transcription factors for cellulase gene expression in ascomycete fungi[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(19): 7397-7402
- [22] Znameroski EA, Glass NL. Using a model filamentous fungus to unravel mechanisms of lignocellulose deconstruction[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6(1): 6
- [23] Adav SS, Ravindran A, Sze SK. Quantitative proteomic analysis of lignocellulolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* on different lignocellulosic biomass[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(5): 1493-1504
- [24] Saykhedkar S, Ray A, Ayoubi-Canaan P, et al. A time course analysis of the extracellular proteome of *Aspergillus nidulans* growing on sorghum stover[J]. Biotechnology for Biofuels, 2012, 5(1): 52
- [25] Jun H, Kieselbach T, Jönsson LJ. Enzyme production by filamentous fungi: analysis of the secretome of *Trichoderma reesei* grown on unconventional carbon source[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10(1): 68
- [26] Craig JP, Coradetti ST, Starr TL, et al. Direct target network of the *Neurospora crassa* plant cell wall deconstruction regulators CLR-1, CLR-2, and XLR-1[J]. mBio, 2015, 6(5): e01452-15