

## 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

辛琪, 徐金涛, 汪天虹, 刘巍峰\*, 陈冠军\*

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

**摘要:**红褐肉座菌 (*Hypocrea jecorina*, 即 *Trichoderma reesei* 的有性型) 是工业上重要的纤维素酶生产菌株, 也是用于研究纤维素酶和半纤维素酶基因转录调控机制的模式菌株。在诱导物存在的条件下, *H. jecorina* 可以迅速启动这些糖苷水解酶基因的转录表达, 但不同的诱导物对纤维素酶和半纤维素酶基因的诱导表达模式存在一定差异。目前对不溶性诱导物如结晶纤维素如何诱导这些基因的起始转录问题有 3 种假设; 并且已发现某些参与调控纤维素酶基因转录的正调控因子 (Xyr1、Ace2、Hap2/3/5) 和负调控因子 (Ace1、Cre1), 这些调控因子可在纤维素酶基因启动子上结合且彼此间可能发生相互作用。本文系统综述了红褐肉座菌纤维素酶基因转录表达调控中的关键因素及其相互作用的相关研究进展。

**关键词:** 红褐肉座菌, 纤维素酶, 半纤维素酶, 诱导机制, 转录调控

**中图分类号:** Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 12-1431-07

地球上存在丰富的木质纤维素资源, 在可循环替代能源及基础化合物生产方面具有巨大的应用潜力。自然界存在许多可有效降解转化木质纤维素的微生物, 其对木质纤维素的降解过程构成了地球碳循环的一个重要方面。丝状真菌是自然界中降解木质纤维素的主要微生物类别, 其中瑞氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 是最重要的代表菌株。瑞氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 最初是在第二次世界大战中因发现其能降解棉纤维、帐篷及子弹带而被从南太平洋索罗门群岛所分离, 20 世纪 60 年代后期开始逐渐被开发为纤维素酶的工业生产菌株。随后的研究分析表明, 瑞氏木霉与泛热带子囊菌红褐肉座菌 (*Hypocrea jecorina*) 的基因序列分析是一致的, 从而证明原称为瑞氏木霉的丝状真菌实际上为红褐肉座菌的无性型<sup>[1]</sup>。根据真菌命名规则, 原瑞氏木霉就改称为红褐肉座菌 (*Hypocrea jecorina*)。

红褐肉座菌 (*H. jecorina*) 产生的纤维素酶系为

全值酶系, 即至少包括 3 类不同的纤维素降解酶: (1) 内切葡聚糖酶 (endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases 或  $\beta$ -1,4-D-glucan-4-glucanohydrolases, EC 3.2.1.4, 简称 EG); (2) 外切葡聚糖酶 (exo-1,4- $\beta$ -D-glucanase, EC 3.2.1.91), 又称纤维二糖水解酶 (cellobiohydrolase 或  $\beta$ -(1,4)-D-glucan cellobiohydrolase, 简称 CBH); (3)  $\beta$ -葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -glucosidase 或  $\beta$ -D-glucoside glucohydrolases, EC 3.2.1.21, 简称 BG)。过去几十年中, 虽然人们对这些酶的生化性能、空间三维结构与酶解机制等都做了较为系统深入的研究, 但纤维素降解研究初始阶段人们所提出的很多生物学问题至今仍没有得到明确和合理的答案<sup>[2]</sup>, 如纤维素降解真菌包括红褐肉座菌 (*H. jecorina*) 如何感应水不溶性的纤维素底物、诱导其纤维素酶转录表达的信号分子是什么、其整个纤维素酶系的表达是如何被调控的等。围绕这些问题的探讨不仅可使我们更为深入地了解这些微生物对纤维素降解的生理意义,

**基金项目:** 国家自然科学基金 (30770063, 30870045); 山东大学自主创新基金; 山东省科技计划项目 (2007JY02)

\* 通信作者。Tel: +86-531-88364324; E-mail: weifliu@sdu.edu.cn; guanjun@sdu.edu.cn

**作者简介:** 辛琪 (1986-), 女, 山东烟台人, 硕士研究生, 研究方向为微生物分子遗传。E-mail: xinqiqiqi@yahoo.com.cn

**收稿日期:** 2010-05-12; **修回日期:** 2010-06-18

而且对进一步提高其纤维素酶产生水平以及利用纤维素酶基因启动子构建高效外源表达体系具有重要的理论与应用价值。本文以红褐肉座菌 (*H. jecorina*) 为例,对丝状真菌纤维素酶基因转录表达调控中的关键因素及其相互作用的相关研究进展进行综述和分析。

## 1 纤维素酶诱导表达机制的假设

现在人们普遍认可的一个观点是:从不溶性纤维素底物中释放的某些可溶性寡糖是诱导纤维素酶表达的真正诱导因子,这主要是因为某些二糖如纤维二糖 (cellobiose)、 $\delta$ -纤维二糖内酯 ( $\delta$ -cellobionolactone)、乳糖 (lactose) 及槐糖 (sophorose, 由 2 个葡萄糖通过  $\beta$ -1,2 糖苷键连结的双糖分子) 等均具有较强的纤维素酶诱导能力。根据已有的研究结果,人们提出了 3 种假设来解释从不溶性底物形成这些可溶性诱导因子的机制<sup>[3]</sup>。第一种假设认为转录因子与靶基因启动子的结合为一动态平衡过程。因此,即使最为严谨的被阻遏或被诱导的基因也会形成低水平“组成型”的表达,即这些真菌可以持续产生低水平的纤维素酶。正是这些低水平纤维素酶的存在足以保证从纤维素底物上释放纤维寡糖,并进而诱导后续纤维素酶的大量产生<sup>[4]</sup>;此外,研究表明,在培养基中葡萄糖耗尽的条件下,纤维素酶基因也可以发生较高水平的转录,其转录产物 mRNA 水平可以达到纤维素诱导培养条件下的 10% 左右<sup>[5]</sup>。由此,第二种假设认为从真菌细胞壁中释放到胞内或通过培养基中已存在的微量葡萄糖进行转糖基反应而形成的某些诱导因子可能参与了诱导过程<sup>[5]</sup>,但这种解释还缺少相关明确的实验证据。第三种假设认为分生孢子表面的几种纤维素酶,尤其是纤维二糖水解酶 (cellobioside hydrolase I 和 II, CBH I 与 CBH II) 可能协同参与了对纤维素分子的最初降解,进而形成后续诱导纤维素酶大量合成的诱导因子。这一种假设的提出是基于只有分生孢子而非菌丝体可以在纤维素底物上生长。同时,在分生孢子表面可以检测到降解结晶纤维素的相关酶类,而这些纤维素酶的产生与生孢条件无关<sup>[6]</sup>。

## 2 诱导物与纤维素酶及半纤维素酶的诱导表达模式

迄今为止,纤维素降解过程中诱导纤维素酶表达的可溶性诱导因子的本质仍然还不清楚。在实验

室条件下,除不溶性的纤维素外,纤维二糖 (cellobiose)、乳糖 (lactose) 及槐糖 (sophorose) 等可溶性二糖均可有效诱导纤维素酶的表达。其中纤维二糖是纤维素降解的主要水解产物,低浓度的纤维二糖并同时添加  $\beta$ -葡萄糖苷酶抑制剂,或利用纤维二糖类似物  $\delta$ -纤维二糖内酯均可诱导大量纤维素酶的产生。与此相反,直接将红褐肉座菌 (*H. jecorina*) 培养在纤维二糖培养基或向其纤维素培养物中添加纤维二糖均可抑制纤维素酶的形成<sup>[7]</sup>,其中主要原因可能与负责向胞内转运纤维二糖的透性酶及水解纤维二糖的  $\beta$ -葡萄糖苷酶间的相对活性有关<sup>[2]</sup>。与纤维二糖相比,槐糖可诱导纤维素酶的高水平表达。由于在红褐肉座菌 (*H. jecorina*) 的发酵液中可检测到槐糖的存在,所以很长一段时间以来,槐糖被认为是该木霉菌自身产生的纤维素酶的天然诱导因子,并推测其主要是由  $\beta$ -葡萄糖苷酶或纤维素内切酶的转糖基活性所介导产生的。但后续研究表明, $\beta$ -葡萄糖苷酶在纤维素酶诱导过程中的作用还有待进一步确定<sup>[8]</sup>。与纤维二糖和槐糖相比,乳糖并非纤维素或其它植物多聚物的正常水解产物,虽然它是来自于动物产生的寡糖,但它对丝状真菌纤维素酶的产生具有良好的诱导作用。另外,从经济性的角度来讲,乳糖也是目前唯一可以直接用来进行纤维素酶大量生产的可溶性碳源。现在还没有确切证据表明乳糖分子是否直接参与纤维素酶的诱导产生,但有遗传学证据显示红褐肉座菌 (*H. jecorina*) 乳糖代谢途径中的某些关键酶可能参与了其对纤维素酶的诱导,而真正发挥诱导功能的代谢产物并不清楚<sup>[9]</sup>。事实上,某些不能被纤维素或槐糖诱导的红褐肉座菌 (*H. jecorina*) 突变体仍可被乳糖所诱导,表明乳糖诱导的信号转导途径可能有别于纤维素或槐糖诱导的信号途径<sup>[9]</sup>。

与黑曲霉中纤维素水解体系及木聚糖水解体系受木糖的严谨共调控有所不同<sup>[10]</sup>,红褐肉座菌 (*H. jecorina*) 中相关水解酶系的调控有相对的独立性,尤其是两个主要木聚糖酶组分 (XYN1 与 XYN2) 因碳源不同而呈现出差异表达的现象。虽然两种基因均可被木聚糖所诱导,但 XYN1 还受木糖的诱导,而低水平组成型转录的 *xyn2* 基因可以被木二糖与槐糖所诱导<sup>[11]</sup>。最新的研究表明,*xyn1* 基因的诱导表达与木糖浓度密切相关,而在合适的低浓度木糖条件下 (0.5 - 1 mol/L), *xyn2* 也可被诱导表达<sup>[12]</sup>。此外,2 种木聚糖酶基因的转录对葡萄糖的响应也不尽相同。当以葡萄糖为唯一碳源时, *xyn2* 基因可以

进行低水平组成型转录,但与木聚糖不同,被木二糖诱导的 *xyn2* 基因转录并不受同时存在的葡萄糖抑制<sup>[11]</sup>。与此类似,被木糖诱导的 *xyn1* 基因转录也不受葡萄糖的影响,虽然葡萄糖本身可完全抑制其转录<sup>[13-14]</sup>。

### 3 纤维素与半纤维素酶基因的转录调控

如前所述,红褐肉座菌(*H. jecorina*)中纤维素酶与半纤维素酶基因的转录表达既呈现出极高的协同性,又具有某些差异。在相关纤维素酶的基因中,*cbh1* 基因的表达水平最高,其次为 *cbh2* 和 *egl5* 基因。通过对这些基因启动子的活性分析发现,这些基因的转录表达受正调控与负调控机制的双重控制。近几年分离鉴定了多个与这些启动子相互作用的转录调控因子,并对它们在相关启动子上的结合及其可能的相互作用模式进行了分析。

#### 3.1 碳源代谢阻遏抑制因子—Cre1

碳源代谢阻遏是一种普遍存在的重要调控机制,当简单碳源如葡萄糖存在时,许多参与其它单糖碳源及复杂碳源利用的酶的基因表达受到阻遏。此机制同样存在于红褐肉座菌(*H. jecorina*)的纤维素酶表达体系中。研究发现,在高水平葡萄糖存在条件下,槐糖无法诱导纤维素酶基因的表达;即使在已经发生诱导的培养物中加入葡萄糖也会导致胞内纤维素酶基因转录产物的消失,此时纤维素酶基因被关闭。Ilmen 等从红褐肉座菌(*H. jecorina*)中克隆到了一个编码碳源代谢阻遏蛋白的基因 *cre1*,其编码的蛋白产物可以结合启动子的保守序列位点 5'-SYGGRG-3'<sup>[15]</sup>。对 *cbh1* 启动子的功能分析发现,在其转录起始位点上游约 700 bp 的位置存在由 2 个反向重复序列组成的 Cre1 结合位点,而对此位点的突变将导致红褐肉座菌(*H. jecorina*)在葡萄糖培养基中发生去阻遏<sup>[16]</sup>。研究结果表明,由酪蛋白激酶 II (casein kinase II) 介导的 Cre1 第 241 位丝氨酸的磷酸化修饰是其在碳源阻遏条件下结合 DNA 所必需的<sup>[17-18]</sup>。在一株普遍使用的纤维素酶高产诱变菌株 RutC-30 中,其 *cre1* 基因仅保留了 20% 的编码区域,编码产物缺少了第一个锌指之后所有的羧基端氨基酸<sup>[16]</sup>。此菌株在葡萄糖存在的情况下,某些纤维素酶基因如 *cbh1* 可发生低水平表达。最新的研究结果显示,通过在野生型菌株敲除 *cre1* 基因或引入 *cre1* 突变,可极为显著地提高重组菌株在非诱导及诱导条件下纤维素酶的表达<sup>[19]</sup>。但需要指出的是,Cre1 并不参与包括 *cbh2* 和 *bgl1* 等纤维素

酶基因的调控<sup>[3, 20]</sup>。

我们通过对自主分离的纤维素酶产生菌-斜卧青霉(*Penicillium decumbens*) *creA* 基因的功能研究发现,CreA 的缺失不仅使斜卧青霉(*P. decumbens*)葡萄糖的阻遏效应得以解除,使  $\Delta creA$  突变株能够在有葡萄糖存在的情况下仍具有较高纤维素酶的表达活性,同时这一缺失突变对该菌的木聚糖酶的诱导也有明显的促进作用。进一步分析发现这种活性表达只对内切葡聚糖酶以及滤纸酶活有增强作用,对外切葡聚糖纤维二糖水解酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶的产量没有明显的影响。此外, $\Delta creA$  突变株菌落的形态与野生型相比也发生了明显的改变。由此可以看出,*creA* 的敲除可能影响这些纤维素降解真菌的多条生长代谢途径。

#### 3.2 纤维素酶基因转录调节因子—Ace1 与 Ace2

Saloheimo 等通过酵母单杂交体系,利用红褐肉座菌(*H. jecorina*) *cbh1* 全长启动子从红褐肉座菌(*H. jecorina*) cDNA 文库中克隆获得了两个相关转录因子—Ace1 与 Ace2<sup>[21]</sup>。其中 Ace1 基因编码一个含有 3 个 Cys(2)-His(2)类锌指结构的 DNA 结合蛋白。体外结合实验表明,Ace1 识别所有 5'-AGGCAA-3'序列位点及前面为富含 A-T 区域的 5'-AGGCA-3'位点序列,它可以与 *cbh1* 启动子中的至少 7 个位点结合。这种相同或相似的位点序列也存在于 *cbh2*、*egl1*、*egl5* 和 *xyn1* 启动子中,因此可以认为 Ace1 可能参与这些基因的调控。*ace1* 基因的敲除导致红褐肉座菌(*H. jecorina*)在纤维素培养基上生长迟缓<sup>[21]</sup>,但后续研究表明在  $\Delta ace1$  菌株中,*xyn1* 及某些纤维素酶基因转录水平却得以提高<sup>[22]</sup>。因此,Ace1 在纤维素酶基因的诱导表达及纤维素利用中的作用可能是较为复杂的,其功能还有待进一步明确。

Ace2 蛋白为双核锌簇类 DNA 结合蛋白,与 Ace1 在其它许多丝状真菌中存在同源蛋白不同,目前在包括曲霉属的丝状真菌中还没有发现其同源蛋白。研究表明,Ace2 可以与 *cbh1* 启动子中转录位点上游 779bp 处的 5'-GGCTAATAA-3'位点结合<sup>[23]</sup>,也可与 *xyn2* 启动子中一段为该基因转录调控所必需的序列元素 XAE (xylanase activating element, 5'-GGGTAAATTGG-3')相结合<sup>[11]</sup>。此外,Ace2 可能还与 *cbh2* 启动子中的 CAE (*cbh2*-activating element, 5'-ATGGGTAATA-3')相结合<sup>[24]</sup>。因此,Ace2 识别的共有序列为 5'-GGSTAATA-3'。基因敲除实验结果显示,在纤维素诱导条件下,*ace2* 的缺失将导致

*cbh1*、*cbh2*、*egl1* 和 *egl2* 转录产物 mRNAs 的诱导动力学降低,且诱导后期相关纤维素酶及 Xyn2 酶活比野生型降低 30–70%<sup>[23, 25]</sup>。

### 3.3 Hap2/3/5 复合物

HAP 复合物最初是因其酿酒酵母中参与细胞色素合成酶基因 *cyc1* 的表达调控而得以被系统研究。该复合物由 4 个亚基组成,即 Hap2p、Hap3p、Hap4p 和 Hap5p,其中 Hap2p、Hap3p 及 Hap5p 形成一个可结合特定 DNA 序列的三体复合物—Hap2/3/5 复合物,且每个亚基均含有 1 个 DNA 结合核心结构域及亚基吸附结构域。Hap4p 含有一段酵母转录激活因子特征性的高度酸化区域,虽然其可与 Hap2/3/5 复合物直接相互作用,但并不参与与 DNA 的结合<sup>[26]</sup>。在后来的研究中发现,在红褐肉座菌(*H. jecorina*)中也存在这种 Hap2/3/5 复合物,参与 *cbh2* 基因的表达,且无论是 *cbh2* 基因的本底组成型表达还是其诱导型表达都依赖于这一复合物的存在<sup>[26]</sup>。迄今为止在丝状真菌中还没有发现 Hap4p 的同源蛋白。研究结果表明,在酿酒酵母与丝状真菌中,HAP 复合物因子结合的 DNA 共有序列均为 5'-CCAAT-3',此序列盒在相关纤维素酶基因及半纤维素酶基因启动子中普遍存在。有证据显示,CCAAT 盒参与活性染色质结构的维持<sup>[27]</sup>,但也有研究发现,*cbh2* 启动子 CAE 元件中 CCAAT 序列的突变将导致 *cbh2* 基因转录水平降低约 30%<sup>[28]</sup>,而 *xyn2* 启动子 XAE 元件中的 CCAAT 盒突变却可使 *xyn2* 基因转录水平增加 20%–30%<sup>[11]</sup>。

### 3.4 木聚糖调控因子—Xyr1

在红褐肉座菌(*H. jecorina*)中,纤维素的降解是在一系列调控因子的共同作用下进行调控的,对于木聚糖的降解该菌也存在一个木聚糖酶调控因子(xylanase regulator 1, Xyr1)。木聚糖酶调控因子的同源蛋白 XlnR 最初是在黑曲霉中分析 *xlnA* 基因启动子活性时被分离鉴定的<sup>[29]</sup>。XlnR 属于真菌所特有的双核锌指类转录因子,此类转录因子还包括已被深入研究的参与酿酒酵母半乳糖代谢酶基因表达调控的转录激活因子 Gal4p<sup>[30]</sup>。与 Gal4p 结构组织类似,介导 XlnR(Xyr1)结合 DNA 的双核锌指结构域位于蛋白的 N-端(aa 49–91)<sup>[31]</sup>。应该指出的是,与 XlnR 相比,Xyr1 在此区域存在两个氨基酸的差异,这可能也是 XlnR 与 Xyr1 在 DNA 结合序列特异性方面存在差异的原因<sup>[31]</sup>。XlnR(Xyr1)蛋白中间区域的一段螺圈式卷曲(coiled-coil)为其核运输定位所必须,而蛋白的 C-末端区域与其转录活性调

节有关<sup>[32]</sup>。研究结果表明,无论诱导物的结构如何,表达模式如何(本底、去阻遏或诱导表达),Xyr1 是主要纤维素酶与半纤维素酶基因包括 *cbh1*、*cbh2*、*egl1*、*bgl1*、*xyn1* 和 *xyn2* 等转录所必须的<sup>[14]</sup>。在  $\Delta xyr1$  菌株中,无论 *xyn1* 的去阻遏或诱导表达,还是 *xyn2* 的本底或诱导表达均不会发生。作为一必须的转录激活因子,有证据显示 *xyr1* 自身的转录受到 Cre1、Ace1 和 Ace2 的调控<sup>[25, 33]</sup>,同时其转录调节活性可能也受到转录因子如 Ace1 与 Ace2 的精细调控。这一调控以红褐肉座菌(*H. jecorina*)*xyn1* 与 *xyn2* 的转录调控尤其代表性<sup>[25, 34]</sup>。在 *xyn1* 的转录表达中,与 *xyn1* 的激活转录需要 Xyr1 二聚体不同, Ace1 可通过与 Xyr1 竞争结合启动子中 Xyr1 的其中一个反向重复结合序列位点,并与 Ace1 相互作用蛋白(Aip)及 Xyr1 形成复合物而抑制 *xyn1* 的转录。与 *xyn1* 相比,*xyn2* 的活跃转录则可能需要 Ace2 与 Xyr1 间发生复杂的相互作用,从而对 Xyr1 的转录激活活性进行调控。

与黑曲霉中受 XlnR 调控基因的 5'上游调控区中只有单一的 XlnR 结合位点的序列不同,红褐肉座菌(*H. jecorina*)中 *xyn1* 与 *xyn2* 基因启动子中的 Xyr1 结合位点为反向重复序列(5'-GGCTAA-3'或 5'-GGGTAA-3'与 5'-GGCTGG-3'),两个结合序列间距为 10 或 12 bp。体内外结合实验表明,反向重复序列中的每一段序列均可结合一分子 Xyr1,且任何一段序列的突变都会消除其与 Xyr1 的结合<sup>[31]</sup>。在非诱导条件下, Ace1 可以竞争结合 *xyn1* 启动子中 Xyr1 结合位点的其中一段反向重复序列,从而干扰活性 Xyr1 二聚体的形成;而对于 *xyn2* 启动子,紧邻 XAE 上游的 5'-AGAA-3'序列可能介导非诱导条件下 *xyn2* 表达的抑制;在诱导条件下, Ace2 则可能通过与 Xyr1 紧密相互作用介导转录活性复合物的形成<sup>[25, 31]</sup>。最近的研究结果显示,在众多受调控的纤维素酶与半纤维素酶基因的启动子中,Xyr1 结合位点不仅仅局限于反向重复序列,散布于上述基因启动子中单独的 5'-GGC(A/T)<sub>3</sub>-3'序列也可能作为体内 Xyr1 的结合位点而发挥重要的调节功能<sup>[35–37]</sup>,但其中的具体调节细节还不清楚。此外,与 *xyn1* 与 *xyn2* 基因的转录调控相比,上述不同转录调节因子在相关纤维素酶基因启动子上的结合及相互作用模式也不清楚。我们实验室目前正在通过分离鉴定红褐肉座菌(*H. jecorina*)中与 Xyr1 相互作用的转录调控因子,在研究这些转录因子相互作用模式的基础上,将深入分析在非诱导及诱导纤维素酶基因表

达的条件下相关转录因子与特定染色质序列动态结合模式及染色质结构的变化。

总之,在过去十几年,人们虽然在丝状真菌特别是红褐肉座菌(*H. jecorina*) 纤维素酶基因表达调控方面取得了长足进步,但对更多未知转录调节因子的分离鉴定及进一步的深入系统研究,尤其是针对其在相关纤维素酶基因启动子上的复杂相互作用模式及其动态变化方面的研究还未能获得突破。加强这方面的研究,不仅可使人们更为深入地了解其诱导表达调控机制,而且也将有助于人们在将来通过遗传工程改造获得纤维素酶/半纤维素酶表达模式改变的高产菌株。

## 参考文献

- [ 1 ] Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels GJ, Kovacs W, Meyer W, Petrini O, Gams W, Borner T, Kubicek CP. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(15): 7755-7760.
- [ 2 ] Kubicek CP, Messner R, Gruber F, Mach RL, Kubicek-Pranz EM. The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, 1993, 15(2): 90-99.
- [ 3 ] Mach RL, Zeilinger S. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 60(5): 515-522.
- [ 4 ] Carle-Urioste JC, Escobar-Vera J, El-Gogary S, Henrique-Silva F, Torigoi E, Crivellaro O, Herrera-Estrella A, El-Dorri H. Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(15): 10169-10174.
- [ 5 ] Ilmen M, Saloheimo A, Onnela ML, Penttila ME. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(4): 1298-1306.
- [ 6 ] Messner R, Kubicek-Pranz EM, Gsur A, Kubicek CP. Cellobiohydrolase II is the main conidial-bound cellulase in *Trichoderma reesei* and other *Trichoderma* strains. *Archives of Microbiology*, 1991, 155(6): 601-606.
- [ 7 ] Fritscher C, Messner R, Kubicek CP. Cellobiose metabolism and cellobiohydrolase I biosynthesis by *Trichoderma reesei*. *Experimental Mycology*, 1990, 14(4): 405-415.
- [ 8 ] Mach RL, Seiboth B, Myasnikov A, Gonzalez R, Strauss J, Harkki AM, Kubicek CP. The *bglI* gene of *Trichoderma reesei* QM 9414 encodes an extracellular, cellulose-inducible beta-glucosidase involved in cellulase induction by sophorose. *Molecular Microbiology*, 1995, 16(4): 687-697.
- [ 9 ] Kubicek CP, Mikus M, Schuster A, Schmoll M, Seiboth B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnol Biofuels*, 2009, 2(1): 19-32.
- [ 10 ] Hasper AA, Visser J, de Graaff LH. The *Aspergillus niger* transcriptional activator XlnR, which is involved in the degradation of the polysaccharides xylan and cellulose, also regulates D-xylose reductase gene expression. *Molecular Microbiology*, 2000, 36(1): 193-200.
- [ 11 ] Wurleitner E, Pera L, Wacenovskiy C, Cziferszky A, Zeilinger S, Kubicek CP, Mach RL. Transcriptional regulation of *xyn2* in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryotic Cell*, 2003, 2(1): 150-158.
- [ 12 ] Mach-Aigner AR, Pucher ME, Mach RL. D-Xylose as a repressor or inducer of xylanase expression in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(6): 1770-1776.
- [ 13 ] Mach RL, Strauss J, Zeilinger S, Schindler M, Kubicek CP. Carbon catabolite repression of xylanase I (*xynI*) gene expression in *Trichoderma reesei*. *Molecular Microbiology*, 1996, 21(6): 1273-1281.
- [ 14 ] Stricker AR, Grosstessner-Hain K, Wurleitner E, Mach RL. Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5(12): 2128-2137.
- [ 15 ] Ilmen M, Thrane C, Penttila M. The glucose repressor gene *creI* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Molecular and General Genetics*, 1996, 251(4): 451-460.
- [ 16 ] Takashima S, Iikura H, Nakamura A, Masaki H, Uozumi T. Analysis of CreI binding sites in the *Trichoderma reesei* *cbhI* upstream region. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, 145(3): 361-366.
- [ 17 ] Cziferszky A, Mach RL, Kubicek CP. Phosphorylation positively regulates DNA binding of the carbon catabolite repressor CreI of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(17): 14688-14694.
- [ 18 ] Cziferszky A, Seiboth B, Kubicek CP. The Snf1 kinase of the filamentous fungus *Hypocrea jecorina* phosphorylates regulation-relevant serine residues in the

- yeast carbon catabolite repressor Mig1 but not in the filamentous fungal counterpart Cre1. *Fungal Genetics and Biology*, 2003, 40(2) : 166-175.
- [19] Nakari-Setälä T, Paloheimo M, Kallio J, Vehmaanpera J, Penttilä M, Saloheimo M. Genetic modification of carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* for improved protein production. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(14) : 4853-4860.
- [20] Margolles-Clark E, Ilmen M, Penttilä M. Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Journal of Biotechnology*, 1997, 57(11) : 167-179.
- [21] Saloheimo A, Aro N, Ilmen M, Penttilä M. Isolation of the *ace1* gene encoding a Cys(2)-His(2) transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(8) : 5817-5825.
- [22] Aro N, Ilmen M, Saloheimo A, Penttilä M. ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1) : 56-65.
- [23] Aro N, Saloheimo A, Ilmen M, Penttilä M. ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(26) : 24309-24314.
- [24] Schmoll M, Kubicek CP. Regulation of *Trichoderma* cellulase formation: lessons in molecular biology from an industrial fungus. A review. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2003, 50(2-3) : 125-145.
- [25] Stricker AR, Trefflinger P, Aro N, Penttilä M, Mach RL. Role of Ace2 (Activator of Cellulases 2) within the *xyn2* transcriptosome of *Hypocrea jecorina*. *Fungal Genetics and Biology*, 2008, 45(4) : 436-445.
- [26] Zeilinger S, Ebner A, Marosits T, Mach R, Kubicek CP. The *Hypocrea jecorina* HAP 2/3/5 protein complex binds to the inverted CCAAT-box (ATTGG) within the *cbh2* (cellobiohydrolase II-gene) activating element. *Molecular Genetics Genomics*, 2001, 266(1) : 56-63.
- [27] Zeilinger S, Schmoll M, Pail M, Mach RL, Kubicek CP. Nucleosome transactions on the *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cellulase promoter *cbh2* associated with cellulase induction. *Molecular Genetics Genomics*, 2003, 270(1) : 46-55.
- [28] Zeilinger S, Mach RL, Schindler M, Herzog P, Kubicek CP. Different inducibility of expression of the two xylanase genes *xyn1* and *xyn2* in *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(41) : 25624-25629.
- [29] van Peij NN, Visser J, de Graaff LH. Isolation and analysis of *xlnR*, encoding a transcriptional activator coordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*. *Molecular Microbiology*, 1998, 27(1) : 131-142.
- [30] van Peij NN, Gielkens MM, de Vries RP, Visser J, de Graaff LH. The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10) : 3615-3619.
- [31] Stricker AR, Mach RL, de Graaff LH. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(2) : 211-220.
- [32] Hasper AA, Trindade LM, van der Veen D, van Ooyen AJ, de Graaff LH. Functional analysis of the transcriptional activator XlnR from *Aspergillus niger*. *Microbiology*, 2004, 150(Pt 5) : 1367-1375.
- [33] Mach-Aigner AR, Pucher ME, Steiger MG, Bauer GE, Preis SJ, Mach RL. Transcriptional regulation of *xyl1*, encoding the main regulator of the xylanolytic and cellulolytic enzyme system in *Hypocrea jecorina*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(21) : 6554-6562.
- [34] Rauscher R, Wurleitner E, Wacenovský C, Aro N, Stricker AR, Zeilinger S, Kubicek CP, Penttilä M, Mach RL. Transcriptional regulation of *xyn1*, encoding xylanase I, in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5(3) : 447-456.
- [35] Furukawa T, Shida Y, Kitagami N, Mori K, Kato M, Kobayashi T, Okada H, Ogasawara W, Morikawa Y. Identification of specific binding sites for XYR1, a transcriptional activator of cellulolytic and xylanolytic genes in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genetics and Biology*, 2009, 46(8) : 564-574.
- [36] Furukawa T, Shida Y, Kitagami N, Ota Y, Adachi M, Nakagawa S, Shimada R, Kato M, Kobayashi T, Okada H, Ogasawara W, Morikawa Y. Identification of the cis-acting elements involved in regulation of xylanase III gene expression in *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Fungal Genetics and Biology*, 2008, 45(7) : 1094-1102.
- [37] Shida Y, Furukawa T, Ogasawara W, Kato M, Kobayashi T, Okada H, Morikawa Y. Functional analysis of the *egl3* upstream region in filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(3) : 515-524.

# Transcriptional regulation of cellulases and hemicellulases gene in *Hypocrea jecorina*-A review

Qi Xin, Jintao Xu, Tianhong Wang, Weifeng Liu\*, Guanjun Chen\*

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

**Abstract:** *Hypocrea jecorina* (anamorph: *Trichoderma reesei*) is the main industrial fungi that can produce large amounts of extracellular cellulases and hemicellulases. It also represents a model system to study the mechanism of transcriptional regulation in eukaryotes. The expression of these hydrolases genes in *Hypocrea jecorina* can be triggered rapidly in the presence of inducers, but differences in the inducing mode of various soluble inducers have been reported. At present, three models have been offered to explain the question of “how an insoluble inducer such as cellulose would initiate the transcription of cellulases?” Moreover, interactions between the identified positive (Xyr1, Ace2, Hap2/3/5) and negative transcriptional regulators (Ace1, Cre1), as well as the interactions between these proteins and the promoters of cellulase and hemicellulase genes have also been primarily characterized. This review focuses on the key factors and the current understanding on the regulation of expression of cellulase and hemicellulase genes in *Hypocrea jecorina*.

**Keywords:** *Hypocrea jecorina*; cellulases; hemicellulases; induction mechanism; transcriptional regulation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30770063, 30870045), by the Independent Innovation Foundation of Shandong University (IIFSD) and by the Planned Science and Technology Project of Shandong Province, China(2007JY02)

\* Corresponding authors. Tel: +86-531-88364324; E-mail: weifliu@sdu.edu.cn; guanjun@sdu.edu.cn

Received: 12 May 2010; Revised: 18 June 2010

## 《微生物学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论, 并要求在文中给出“【目的】、【方法】、【结果】和【结论】”等字样。具体地讲就是研究工作的主要对象和范围, 采用的手段和方法, 得出的结果和重要结论。在结果和讨论中应写明本文的创新之处。
2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望。
3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。要求在文中按照 [ Objective ]、[ Methods ]、[ Results ]、[ Conclusion ] 顺序分项撰写。英文摘要完成后, 务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。
  - (1) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。
  - (2) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献的还是作者的。
  - (3) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。
  - (4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。
  - (5) 摘要中不用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA、ATP 等。
  - (6) 句子的开头处最好不要使用数字。