

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (12) :1438 – 1445; 4 December 2014
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.12.006

过表达全局调控因子 *LaeA* 对橘青霉美伐他汀的合成及产孢的影响

郑跃亮, 曹双, 黄宇琪, 廖国建, 胡昌华*

西南大学药学院, 重庆药物过程与质量控制工程技术中心, 重庆 400715

摘要: 【目的】研究橘青霉中全局性调控因子 *LaeA* 过表达对美伐他汀生物合成过程及产孢的影响。【方法】同源克隆法从橘青霉中克隆获得 *laeA* 基因, 构建 pGiHTGi-*laeA* 载体, 经农杆菌介导转化转入橘青霉, 利用 *hygromycin* 基因进行阳性克隆子的 PCR 筛选。使用 HPLC 方法比较 PGA 发酵液中橘青霉野生型菌株 WT 和 *LaeA* 过表达菌株 OE::*laeA* 的美伐他汀产量差异。血球计数法进行孢子产量比较。荧光定量 PCR 方法分析 WT 和 OE::*laeA* 中美伐他汀合成基因簇表达量。【结果】成功构建 pGiHTGi-*laeA* 载体, 并获得 *LaeA* 过表达橘青霉菌株 (OE::*laeA*)。OE::*laeA* 中, *laeA* 基因表达量较 WT 增加 29%, *mlcB* 表达量较 WT 增加 72%, *mlcR* 表达量增加 153%, 孢子产量由 $(2.38 \pm 0.24) \times 10^7 / \text{cm}^2$ 减少到 $(1.40 \pm 0.11) \times 10^7 / \text{cm}^2$, 美伐他汀产量从 $(35.77 \pm 4.63) \text{ mg/L}$ 提高到 $(201.46 \pm 9.98) \text{ mg/L}$ 。【结论】在橘青霉中过表达 *LaeA* 可能通过提高 *mlcR* 和 *mlcB* 基因的转录来增加美伐他汀的产量, 同时过表达 *laeA* 基因不利于孢子的形成。这些结果为美伐他汀生物合成的全局性调控和高产菌株的开发提供基础。

关键词: 全局性调控因子 *LaeA*, 过表达, 美伐他汀, 途径调控因子 *mlcR*, 橘青霉

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 12-1438-08

真菌作为重要的微生物资源, 能产生大量的次级代谢产物, 对社会经济和人类健康有重要影响, 其代谢调控机制被广泛地研究。真菌次级代谢是一个复杂的多层次调控过程。次级代谢产物的生物合成不仅受到途径特异性转录因子的调控, 而且受到全局性调控因子的控制^[1-2]。*LaeA* 是 2004 年首次在构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 中被发现的第一个丝状真菌全局性调控因子^[3], 继而在黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)、产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*)、轮状镰刀霉菌 (*Fusarium*

verticillioides) 等丝状真菌中相继被报道^[4-7], *LaeA* 作为功能保守的核蛋白甲基转移酶, 不仅能够全局性调控抗生素和真菌毒素等已知次级代谢产物的合成, 影响真菌形态分化, 还能通过激活沉默基因的表达从而调控未知代谢产物的产生^[2,8], 为真菌中天然产物的开发提供了一种新的途径。

本实验室前期研究发现产美伐他汀的重要药用真菌橘青霉 (*Penicillium citrinum*) 存在全局性调控因子 *LaeA*^[9], 但其功能结构域以及对美伐他汀生物合成的调控机理仍不清楚。Baba 等报道了美伐他

基金项目: 重大新药创制专项创新药物孵化基地子课题 (2010zx09401-306-4-4); 重庆科技攻关项目 (cstc2013jcsf10002)

* 通信作者。E-mail: chhhu@swu.edu.cn

作者简介: 郑跃亮 (1989-), 男, 四川内江人, 硕士研究生, 从事微生物药学方面的研究。E-mail: 865048078@qq.com

收稿日期: 2014-04-24; 修回日期: 2014-08-20

汀高产橘青霉菌株 S-1567 中的 *LaeA* 比野生型菌株 SANK18767 中 *LaeA* 多 15 个氨基酸, 且能通过激活途径调控因子 *MlcR* 和生物合成基因的表达量从而提高美伐他汀生物合成, 但野生型 *LaeA* 并不产生这个作用, 提示终止密码子突变导致增加的 15 个氨基酸可能起关键作用, 但该文章并没有探讨机制^[10], 这与其他真菌 *LaeA* 的全局性调控作用有一定差异。因此, 本工作旨在利用农杆菌介导转化真菌方法将 ATCC 来源的野生原始菌株橘青霉 ATCC38065 中 *LaeA* 进行过表达, 研究 *LaeA* 对美伐他汀生物合成的影响及其调控机制, 为美伐他汀生物合成的全局性调控和高产菌株的开发提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 本研究所使用的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 及农杆菌 (*Agrobacterium*) LBA4404 均为

实验室保藏菌种, 橘青霉 (*Penicillium citrinum*) ATCC38065 购自美国菌种保藏中心。

1.1.2 培养基: 本研究所用 LB 肉汤培养基、LB 肉汤琼脂培养基、MM (Minimal medium)、IM (Induction medium)、CM (Co-cultivation medium) 均参照文献 [11]。MEA (Malt Extract Agar) 培养基配方来源于美国菌种保藏中心 ATCC。PGA (Patato Glycerol Agar) 液体培养基甘油 (Glycerol) 浓度为 10% (M/V)。

1.1.3 主要试剂: 限制性内切酶 *Xba* I、*BsetE* II、*Bam*H I、*Sac* I 和 T4 连接酶购自 TaKaRa 公司。*EasyTaq* DNA 聚合酶, 纯化试剂盒, 胶回收试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。OMEGA 真菌 RNA 提取试剂盒 (OMEGA), Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)。

1.2 引物

本实验所用引物 (表 1) 均为 Primer 5.0 软件设计, 由商业公司合成。

表 1. 本实验所涉及到的引物
Table 1. The primers in this study

Primer	Sequences (5'→3')	T_m / °C	Production / bp
<i>laeA-F</i>	AATATCAACGGATCCATGTCTTACAGAGAG	50	1340
<i>laeA-R</i>	TCACCAGGGAGCTCTTATTCCTCGAGAGG		
<i>hyg-F</i>	CTGCTGCTCCATACAAGCCAACC	55	450
<i>hyg-R</i>	CAAGACCTGCCTGAAAACCGAACT		
<i>PgpdAi-F</i>	GATGGTGACCGTTACCATGGGGTGACTCTTTCTGGCAT	55	908
<i>PgpdAi-R</i>	TGCTCTAGAGACTCCATGGTGGTGATGTCTGCTCAAGCG		
Primers for qRT-qPCR			
<i>pcilaeA-F</i>	CATCCTGATTCCCACGAGC	56	92
<i>pcilaeA-R</i>	CGACTGAAAGGAGCCAGACAC		
<i>mlcR-F</i>	GGTCATCGGTTGTGAGGTTTC	57	105
<i>mlcR-R</i>	GCCGGATTAAGGTGTGTGTAG		
<i>mlcB-F</i>	GAGAAAAGCCGTCGATGTGATT	54	126
<i>mlcB-R</i>	GCGAGAAAAGGCAACTGAGATA		
<i>pgk-F</i>	ACCGCTCCATCGTCATC	52	103

1.3 DNA 的提取及 *laeA* 的克隆

使用“快捷性植物基因组 DNA 提取系统” (TIANGEN) 对桔青霉进行 DNA 提取。使用引物 *laeA-F* 和 *laeA-R* 对 *laeA* 进行克隆, PCR 反应采用 50 μ L 体系: 浓度均为 0.01 mol/L 的正反向引物各 1.5 μ L, 5 μ L 10 \times *EasyTaq* Buffer, 4 μ L 2.5 $\times 10^{-6}$ mol/L dNTP, 0.5 μ L *EasyTaq* DNA polymerase, 36 μ L ddH₂O, 1.5 μ L 橘青霉的 DNA。PCR 程序如下: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个

循环; 72°C 10 min。PCR 产物使用 1% 琼脂糖凝胶进行分析, 结果进行测序比较。

1.4 农杆菌介导转化载体 pGiHTGi-*laeA* 的构建

以植物高效表达载体 p1304 + (pCaMBIA1304)^[12] 为原始质粒, 逐步改造为实验室常用载体 pGiHT + P_{trpC}。将 pGiHT + P_{trpC} 作为基本骨架进行 *Xba* I、*BsetE* II 双酶切, 随后与用 *PgpdAi-F* 和 *PgpdAi-R* 从 PAN7-1 上克隆得到的磷酸甘油醛脱氢酶启动子 *PgpdAi* 进行连接, 从而获得

本实验所用的 pGiHTGi 载体 (PAN7 - 1 和 p1304 + 由中国科学院微生物研究所刘杏忠研究员馈赠)。将 pGiHTGi 载体进行 *Bam*H I、*Sac* I 双酶切后,与从橘青霉中扩增得到的 *laeA* 进行连接获得质粒 pGiHTGi-*laeA*。转入大肠杆菌 JM109 中,PCR 验证,测序验证。

1.5 pGiHTGi-*laeA* 的转化及筛选

pGiHTGi-*laeA* 使用卡那霉素 (Kanamycin 50 μ g/mL) 作为筛选标记,经大肠杆菌、农杆菌转化获得农杆菌转化子。农杆菌介导转化真菌:将含 pGiHTGi-*laeA* 的 LBA4404 在 MM 培养液中,28 $^{\circ}$ C,210 r/min 条件下培养 2 d,测 OD_{600} ;取一定量 MM 培养液,用 IM 培养液将其稀释至 OD_{600} 约为 0.15,于 28 $^{\circ}$ C,210 r/min 条件下培养至 OD_{600} 为 0.4 - 0.6,将此时的菌液与在 MEA 上生长 4d 浓度为 10^7 的孢子按 1:1 的比例进行混合在覆盖有玻璃纸的 CM 培养基上进行共培养,培养条件为 20 $^{\circ}$ C,2 d。2 d 后将 CM 上的玻璃纸转至含抗性的 MEA (Cefotaxime 500 μ g/mL,Hygromycin B 200 μ g/mL) 上生长 3 - 5 d,将 MEA 上的转化子转至含 Cefotaxime 500 μ g/mL,Hygromycin B 100 μ g/mL) 的 MEA 上进行二次筛选和 PCR 验证。

1.6 发酵培养及分析

按 10^7 /100mL 的浓度将橘青霉 (WT 和 OE:: *laeA*) 接种于含 30 mL pH (6.2 \pm 0.2) PGA 培养基的 250 mL 摇瓶中,210r /min 发酵 8d 后,用 2 倍初始培养基体积的甲醇对发酵液进行浸提,浸提液用 NaOH 调 pH 为 10,摇床上振荡浸提 24h。抽滤,取上清,用 0.22 μ m 的微孔滤头进行过滤,使用 HPLC 进行次级代谢谱检测。美伐他汀检测条件为乙腈:水 (pH3.0,醋酸或磷酸调 pH) = 60:40,检测波长 237 nm,流速 1 mL/min。检测结果使用 origin7.5 进行数据分析和作图。

1.7 菌丝形态观察及孢子产量统计

于提前插上盖玻片的 MEA 培养基上接种 10 μ L 1×10^7 /mL 孢子悬液用于菌丝的显微镜观察,每隔 12 h 取样观察 1 次。接种 50 μ L 1×10^7 /mL 孢子悬液于牛津杯中,于 MEA 上培养 5 d,比较 *LaeA* 过表达对橘青霉菌落形态的影响。200 μ L 10^7 /mL 孢子悬液均匀涂布于直径为 9 cm 的 MEA 平板上,25 $^{\circ}$ C 黑暗条件下培养 5 d,纯水收集孢子,4 层擦镜纸过滤,血球计数法统计孢子量,3 样本平

行,3 次操作重复。

1.8 实时定量 PCR 分析

收集 PGA 发酵 5d 的橘青霉野生型 WT 和 *LaeA* 过表达 OE:: *laeA* 菌株菌体,将菌体进行抽滤,水冲洗,并用纸吸干表面的水,所得菌体暂放于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱储存。使用前从 -70 $^{\circ}$ C 冰箱取出,液氮研磨,使用 OMEGA 真菌 RNA 提取试剂盒进行 RNA 提取。DNase 酶进行 RNA 纯化,Transcriptor First Strand cDNA Synthesisi Kit 进行反转录获得 cDNA,以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 分析。反应条件采用两步法:95 $^{\circ}$ C,3 min,1 个循环;95 $^{\circ}$ C,15 s,X $^{\circ}$ C,30 s,40 个循环;melt curve:65 $^{\circ}$ C - 95 $^{\circ}$ C (0.5 $^{\circ}$ C,0.05 min)。以橘青霉中的 *pgk* 基因作为参比基因,根据 $2^{-\Delta CT}$ 法计算表达量分析全局性调控基因 *laeA*,美伐他汀合成基因簇调控基因 *mlcR*,美伐他汀合成基因簇基因 *mlcB*。使用 origin7.5 分析表达量并作图,两组间的显著性差异使用 SPSS19.0 进行 t 检验分析。

2 结果

2.1 pGiHTGi-*laeA* 的构建

以植物高效表达载体 p1304 + 为原始质粒,向其引入从 PAN7-1 上克隆得到的强启动子 PgpDAi (磷酸甘油醛脱氢酶启动子),从而获得农杆菌表达载体 pGiHTGi。将 pGiHTGi 载体进行 *Bam*H I、*Sac* I 双酶切后,与橘青霉中扩增得到的 *laeA* 进行连接得到 pGiHTGi-*laeA*。

2.2 橘青霉过表达 *LaeA* 菌株的筛选

将所得质粒 pGiHTGi-*laeA* 经 *E. coli* JM109 和 *Agrobacterium* LBA4404 转入橘青霉中,通过 pGiHTGi-*laeA* 载体所带的 *hyg* (潮霉素抗性基因) 对转化子进行抗性和 *hyg* 基因的 PCR 筛选,获得过表达 *LaeA* 的抗性菌株 (图 1)。

2.3 过表达 *LaeA* 对美伐他汀产量和孢子形成的影响

250 mL 摇瓶发酵检测橘青霉野生菌株 WT 和 *LaeA* 过表达菌株 OE:: *laeA* 在 25 $^{\circ}$ C、210 r/min、黑暗条件下发酵 1 - 8 d 的美伐他汀产量。将发酵液用 2 倍甲醇进行浸提 (每瓶按初始 30mL 的培养液进行甲醇添加),菌株同时做 3 个平行,发酵实验重复 3 次。如图 2-B 所示:WT 菌株从第 4 天开始产量趋于稳定,美伐他汀第 8 天终产量为 (35.77 \pm

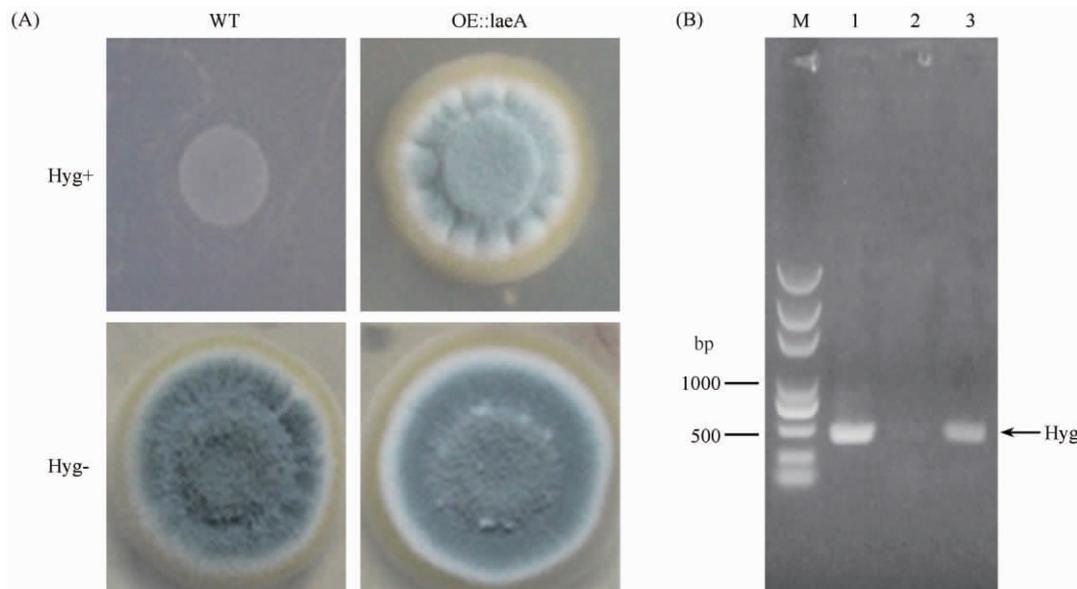


图 1. *OE::laeA* 的筛选与鉴定

Figure 1. Screening and identification of *OE::laeA*. A: Screening of *OE::laeA* on plate with hygromycin. B: Identification of positive transformants by cloning the hygromycin gene. M, DNA Marker DL5000; lane 1, PCR result of vector pGiHTG-laeA; lane 2, PCR result of WT genome; lane 3, PCR result of *OE::laeA* genome.

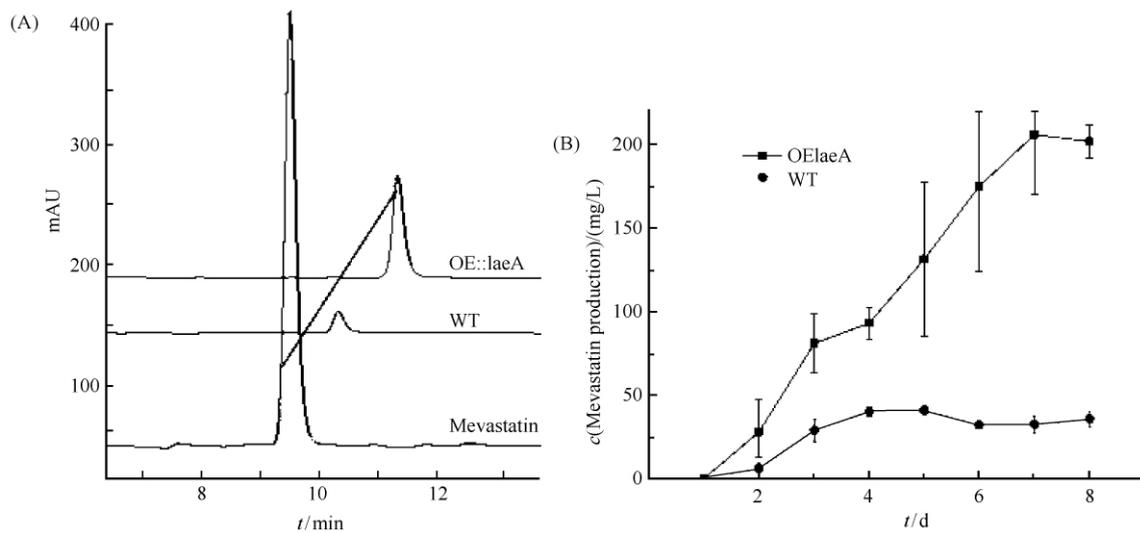


图 2. *LaeA* 过表达对橘青霉美伐他汀生物合成积累量的影响

Figure 2. Effects of *LaeA* overexpression on mevastatin production in *Penicillium citrinum*. A: HPLC results of mevastatin production in WT and *OE::laeA*; B: Time-course relationship of mevastatin production in WT and *OE::laeA*.

4.63) mg/L, *OE::laeA* 菌株的产量直到第 7 天才趋于稳定, 第 8 天产量为 201.46 ± 9.98 mg/L, *OE::laeA* 菌株美伐他汀产量是 WT 菌株的 5.63 倍 ($P < 0.01$)。这表明橘青霉中 *LaeA* 能正向调控美伐他汀的合成, 延长美伐他汀的产生时间, 从而实现美伐他汀积累量的显著提升。

使用插片法观察 *OE::laeA* 菌株和 WT 菌株时发现: *LaeA* 过表达会使橘青霉孢子束上的孢子明显减少 (如图 3-B 所示)。对菌落进行观察发现, 相同接种量和相同培养时间的 *OE::laeA* 菌株菌落颜色明显较 WT 菌株浅 (图 3-A)。将 $200 \mu\text{L } 10^7/\text{mL}$ 孢子涂布于直径为 9cm 的 MEA 平板上, 25°C 黑暗条

件下培养 5 天,收集孢子计数比较。*LaeA* 过表达会使橘青霉的孢子产量明显减少,由 $(2.38 \pm 0.24) \times 10^7/\text{cm}^2$ 减少到 $(1.40 \pm 0.11) \times 10^7/\text{cm}^2$ (图 3-C)。

2.4 *LaeA* 过表达对美伐他汀合成基因的影响

将反转录所得 WT 和 OE::*laeA* 菌株的 cDNA 进行 qRT-PCR 检测,使用内参基因 *pgk* 将 cDNA 初始模板进行归一化处理。用 ΔCq 算法对菌株中 *laeA*、*mlcR*、*mlcB* 的表达量进行分析。与 WT 相比,

OE::*laeA* 中 *LaeA* 的过表达伴随着自身表达量的提高增加了美伐他汀合成基因 *mlcB* 和调控基因 *mlcR* 表达量。如图 4 所示,OE::*laeA* 菌株中 *laeA* 表达量是 WT 的 $1.29 + 0.17$ 倍 ($P < 0.05$),*mlcB* 表达量是 WT 的 $1.72 + 0.09$ 倍 ($P < 0.01$),*mlcR* 的表达量是 WT 中的 $2.53 + 0.64$ 倍 ($P < 0.01$)。这些结果提示橘青霉中 *LaeA* 可能通过对美伐他汀生物合成基因的影响,从而参与美伐他汀的生物合成。

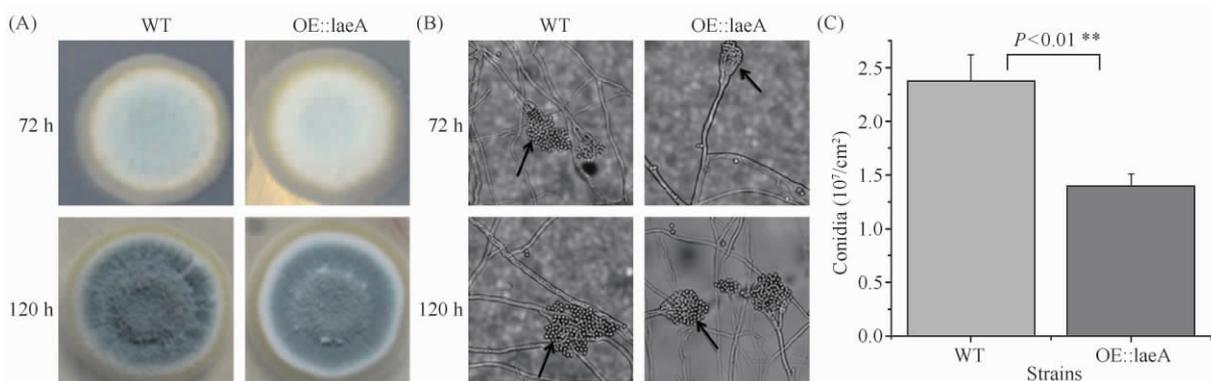


图 3. *LaeA* 过表达对橘青霉孢子形态和产量的影响

Figure 3. Effects of *LaeA* overexpression on conidia production in *Penicillium citrinum*. A. Comparison of colonial morphology in WT and OE::*laeA*; B. Comparison of mycelial morphology in WT and OE::*laeA*; C. Comparison of conidia production in WT and OE::*laeA*. [$P < 0.05$, significant difference (*); $P < 0.01$, extreme significant difference (**)]

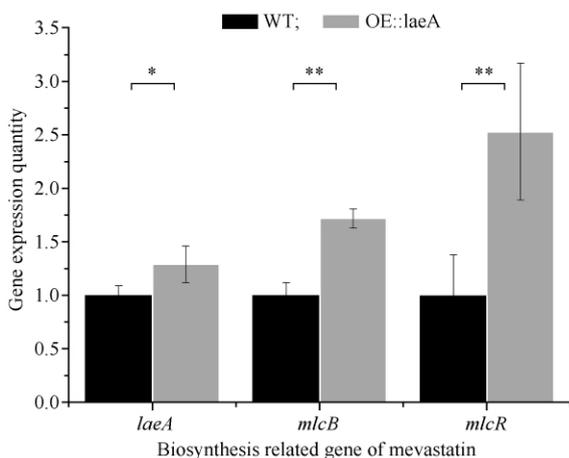


图 4. *LaeA* 过表达对美伐他汀生物合成基因 *mlcB* 和途径调控基因 *mlcR* 的影响

Figure 4. The effect of overexpression of *LaeA* on mevastatin biosynthetic gene *mlcB* and pathway regulator gene *mlcR*. [$P < 0.05$, significant difference (*); $P < 0.01$, extreme significant difference (**)]

3 讨论

本研究发现,橘青霉全局调控因子 *LaeA* 的过表达可显著延长美伐他汀的生产时间,使发酵平台期由第 4 天推迟到第 7 天。发酵平台期的推迟有助于美伐他汀产量积累,使美伐他汀产量从 $(35.77 \pm 4.63) \text{ mg/L}$ 增加到 $(201.46 \pm 9.98) \text{ mg/L}$ 。*LaeA* 的过表达会使美伐他汀生物合成主要基因 *mlcB* 表达量增加 72%,途径调控因子 *mlcR* 表达量增加 153%。这些结果显示,*LaeA* 能正向调控美伐他汀途径调控因子 *mlcR* 的表达量,使 *MlcR* 长时间处于较高水平,从而相比于 WT 菌株能更好的影响美伐他汀合成基因簇的表达,进而影响美伐他汀的产量。近年来,许多关于 *LaeA* 的报道均表明,*LaeA* 能够影响丝状真菌的次级代谢。例如,在产黄青霉中 *laeA* 过表达株会使青霉素的产量增加 25%,*laeA* 敲除株则会导致青霉素合成基因簇的表达受阻,从而导致青霉素产量大幅度减少^[6]。同样地,在黄曲霉中,

laeA 敲除株会使 *qfIR*, *nor1* 和 *qfIJ* 等 aflatoxin 生物合成基因表达量降低 23% - 37%^[13]。

本研究还发现, *LaeA* 过表达能负调控橘青霉的产孢能力, 使孢子产量从 $(2.38 \pm 0.24) \times 10^7 / \text{cm}^2$ 减少到 $(1.40 \pm 0.11) \times 10^7 / \text{cm}^2$ 。 *LaeA* 能调控丝状真菌的孢子产量, 但在不同丝状真菌中调控作用不一致, 可能存在不同的机制。例如, 在产黄青霉中 *LaeA* 正调控孢子产量, *laeA* 敲除株会导致孢子产量大幅度减少^[6]; 但在黄曲霉中 *LaeA* 负调控孢子产量, *laeA* 敲除株能增加孢子产量, *laeA* 过表达株会导致孢子产量减少, 黄曲霉毒素的产量与菌核数量成负相关, 菌核数量越多, 黄曲霉毒素产量越低^[14]。换言之, 在营养条件相同的条件下, 菌体生长越快, 所需要消耗的营养就会越多, 这将导致菌体用于产生非必需的次级代谢的营养较少, 从而最终导致次级代谢产物减少。因此, 在橘青霉中, *LaeA* 的过表达导致橘青霉产孢能力下降, 从而使菌体有更充足的营养用于美伐他汀的生物合成。

LaeA 作为一种全局性调控因子, 从发现到现在近 10 年的研究中已先后在十余种丝状真菌中得到证实^[2, 15], 并作为一种改良真菌代谢产物的主要靶标引起科学家的持续关注。过表达 *LaeA* 可以引起相应真菌的主要代谢产物的产量升高, 当构巢曲霉的 *laeA* 基因在土曲霉 (*Aspergillus terreus*) 中过表达时, 洛伐他汀基因 (*lovE* 和 *lovC*) 表达水平显著提高, 洛伐他汀的产量显著提升; 而当土曲霉洛伐他汀基因簇在构巢曲霉中异源表达时, $\Delta laeA$ 导致 *lovE* 和 *lovC* 基因表达水平的下降, 以及洛伐他汀中间代谢物莫那可林 J 的产量减少^[16]。 *laeA* 基因的这种异源调控作用表明其在生物进化过程中的功能保守性。美伐他汀与洛伐他汀具有相似的生物合成基因簇结构和生物合成途径^[13], 因此, 美伐他汀的生物合成也有可能受到 *LaeA* 的调控。本课题组已经成功克隆到橘青霉的全局性调控基因 *pci-laeA*, 测序结果表明其基因序列与产黄青霉中报道的 *laeA* 基因具有 95% 的同源性, 发酵过程研究显示 *pci-laeA* 与美伐他汀的合成时间正相关^[9], 因此本研究过表达 *LaeA* 增加了美伐他汀的生物合成量, 降低了孢子的形成, 说明 *LaeA* 能够参与橘青霉主要次级代谢产物的生物合成, 可能成为后期美伐他汀高产菌株构建的潜在靶标。

已有研究报道, *LaeA* 对真菌次级代谢产物合成

酶的调控主要表现为转录激活。在构巢曲霉中, *LaeA* 可上调异青霉素 N 合成酶基因 *ipnA* 的 mRNA 水平, 从而提高了青霉素产量^[3]。在产黄青霉中, 编码青霉素生物合成酶的基因 (*pcbAB*、*pcbC* 和 *penDE*) 成簇存在, 其表达受到产黄青霉全局性调控因子 Pc-*LaeA* 的调控^[6]。当 *laeA* 基因高表达时, *pcbC* 和 *penDE* 两个基因的表达水平同时上调, 青霉素的单位产量提高; 反之, *laeA* 基因沉默显著抑制了青霉素生物合成基因簇的表达以及青霉素的产生。橘青霉美伐他汀的生物合成基因簇全长 38kb, 由 9 个基因 *mlcA-mlcH* 和 *mlcR* 组成, 其中 *mlcA* 和 *mlcB* 编码聚酮合酶, *mlcR* 是含有锌指结构的途径调控因子^[13, 18], 因此本研究选择 *mlcB* 和 *mlcR* 作为 *LaeA* 过表达对美伐他汀生物合成基因和途径调控因子的代表, 结果证实 *LaeA* 可能通过转录激活 *mlcR* 影响 *mlcB* 的表达, 提高美伐他汀的产量。

LaeA 不仅对已知的主要次级代谢物有调控作用, 而且还能调控其他未知代谢物的产生。Bok 等^[3] 发现, 通过对构巢曲霉 *laeA* 突变菌株与野生型菌株的代谢产物进行 TLC 比较分析, *laeA* 突变菌株中的菌体色素和其他多种未知代谢产物明显减少, 同时伴随着另外两种未知代谢产物的增加。野生型 *laeA* 基因回补能够恢复 *laeA* 突变菌株中这些代谢物的产量。Bouhired 等进行了构巢曲霉中 $\Delta laeA$ 、OE::*laeA* 和野生型菌株转录组芯片比较分析, 发现 *LaeA* 调控许多未知的次级代谢基因簇的表达, 并鉴定了其中一个新的次级代谢基因簇及其编码的一个新的具有抗肿瘤活性的天然产物 terrequinone A^[19]。本实验由于代谢产物涉及的检测方法和培养基条件主要用于检测橘青霉中的美伐他汀, 橘青霉中其它已知的次级代谢产物, 如 Citrinin、Tanzawaic acid A 和 Asteric acid 等次级代谢产物^[20] 暂未进行相关检测, 过表达菌株的培养基条件的优化工作正在进行中, *LaeA* 是否也能调控其他次级代谢产物的合成还有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Wiemann P, Keller NP. Strategies for mining fungal natural products. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41 (2) :301-313.
- [2] Brakhage AA. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Review Microbiology*, 2013, 11: 21-

- 32.
- [3] Bok JW, Keller NP. LaeA, a Regulator of Secondary Metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic Cell*, 2004, 3 (2) :527-535.
- [4] Kale SP, Milde L, Keller NP, Bok J. Conservation of the aflatoxin regulatory protein LaeA in *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 2007, 97 (7) : S55.
- [5] Seiboth B, Karimi RA, Phatale PA, Linke R, Hartl L, Sauer DG., Smith KM, Baker SE, Freitag M, Kubicek CP. The putative protein methyltransferase LAE1 controls cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *Molecular Microbiology* 2012, 84 (6) : 1150-1164.
- [6] Kosalkova K, Garcia-Estrada C, Ullan RV, Godio RP, Feltrer R, Teixeira F, Mauriz E, Martin JF. The global regulator LaeA controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie*, 2009, 91 (2) : 214-225.
- [7] Butchko RAE, Brown DW, Busman M, Tudzynski B, Wiemann P. Lae1 regulates expression of multiple secondary metabolite gene clusters in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetic and Biology*, 2012, 49 (8) : 602-612.
- [8] Jain S, Keller NP. Insights to fungal biology through LaeA sleuthing. *Fungal Biology Reviews*, 2013, 21 (7) : 51-59.
- [9] Xing W, Deng C, Hu CH. Molecular cloning and characterization of the global regulator LaeA in *Penicillium citrinum*. *Biotechnol Lett*, 2010, 32 (11) :1733-1737.
- [10] Baba S, Kinoshita H, Nihira T. Identification and characterization of *Penicillium citrinum* VeA and LaeA as global regulators for ML-236B production. *Curr Genet*, 2012, 58:1-11.
- [11] Maruthachalam K, Klosterman SJ, Kang S, Hayes RJ, Subbarao KV. Identification of pathogenicity-related genes in the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated T-DNA insertional mutagenesis. *Molecular Biotechnology*, 2011, 49:209-221.
- [12] Zhang P, Xu Bin, Wang Y, Li Y, Qian Z, Tang S, Huan S, Ren S. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the fungus *Penicillium marneffeii*. *Mycological Research*, 2008, 943-949.
- [13] Chang PK, Scharfenstein LL, Ehrlich KC, Wei Q, Bhatnagar D, Ingber BF. Effects of laeA deletion on *Aspergillus flavus* conidial development and hydrophobicity may contribute to loss of aflatoxin production. *Fungal Biology*, 2012, 298-307.
- [14] Amaike S, Keller NP. Distinct roles for VeA and LaeA in development and pathogenesis of *Aspergillus flavus*. *Eukaryotic Cell*, 2009, 8 (7) :1051-1060.
- [15] Feng H, Xing W, Hu C. Research advances in global regulator LaeA in filamentous fungi — A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (9) : 1141-1145. (in Chinese)
冯慧云, 邢伟, 胡昌华. 丝状真菌新型全局性调控因子 LaeA. *微生物学报*, 2011, 51 (9) : 1141-1145.
- [16] Brakhage AA, Schroeckh V. Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genetic and Biology*, 2011, 48:15-22.
- [17] Abe Y, Suzuki T, Ono C, Hosobuchi, M, Yoshikawa H. Molecular cloning and characterization of an ML-236B (compactin) biosynthetic gene cluster in *Penicillium citrinum*. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 267 (5) :636-646
- [18] Abe Y, Ono C, Hosobuchi M, Yoshikawa H. Functional analysis of *mlcR*, a regulatory gene for ML-236B (compactin) biosynthesis in *Penicillium citrinum*. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 268 (3) :352-361.
- [19] Bouhired S, Weber M, Kempf-Sontag A, Keller NP, Hoffmeister D. Accurate prediction of the *Aspergillus nidulans* terrequinone gene cluster boundaries using the transcriptional regulator LaeA. *Fungal Genetic and Biology*, 2007, 44 (11) :1134-1145.
- [20] Katarina Kopke BH, Sandra Bloemendal, Alexandra Katschorowski, Jens Kamerewerd, Ulrich Kück. Members of the *Penicillium chrysogenum* velvet complex play functionally opposing roles in the regulation of penicillin biosynthesis and conidiation. *Eukaryotic Cell*, 2013, 12 (2) : 299-310.

Overexpression of *LaeA* enhances mevastatin production and reduces sporulation of *Penicillium citrinum*

Yueliang Zheng, Shuang Cao, Yuqi Huang, Guojian Liao, Changhua Hu*

College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University; Chongqing Engineering Research Center for Pharmaceutical Process and Quality Control, Chongqing 400715, China

Abstract: [Objective] To study the regulation of *laeA* overexpression on mevastatin production and sporulation in *Penicillium citrinum*. [Methods] We cloned the *laeA* gene from *Penicillium citrinum* and constructed the vector pGiHTGi-*laeA*. The plasmid pGiHTGi-*laeA* was transformed in *Penicillium citrinum* by agrobacterium tumefaciens-mediated transformation. Positive transformants were detected by cloning the hygromycin gene. The mevastatin production of the wild type and OE::*laeA* was compared by HPLC. The conidia number was counted by blood counting chamber. The biosynthetic gene cluster expression quantity of mevastatin in the wild type and OE::*laeA* were analyzed by qRT-PCR.

[Results] We constructed the plasmid pGiHTGi-*laeA*, and screened the positive transformants that overexpress the *laeA* in *Penicillium citrinum*. With the overexpression of *laeA*, the mevastatin production was increased from (0.69 ± 0.12) mg/g to (4.02 ± 0.50) mg/g dry cell weight. Compared to the wild type strain, the *laeA* expression quantity in the OE::*laeA* strain increased 29%, and the *mlcB* expression increased 72%, the *mlcR* expression increased 153%. Moreover, the overexpression of *laeA* would decrease the conidia number. [Conclusion] Overexpression of *LaeA* enhances mevastatin production and reduces sporulation of *Penicillium citrinum*, with increases expression of pathway-regulator *mlcR*, and biosynthetic gene *MlcR*. These results could guide global regulatory mechanism of mevastatin biosynthesis and the exploitation of high-production strain.

Keywords: global regulator *laeA*, overexpression, mevastatin production, pathway regulator *mlcR*, *Penicillium citrinum*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the sub-Project of Major Drug Discovery Project-Drug Innovation Incubator Base Project (2010zx09401-306-4-4) and by the Grants of Chongqing Key Program of Science and Technology Development (cstc2013jcsf10002)

* Corresponding author. E-mail: chhhu@swu.edu.cn

Received: 24 April 2014 / Revised: 20 August 2014