微生物学报
Acta Microbiologica Sinica
2021, 61(3): 695–706
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20200339

Research Article 研究报告

基于RNA-Seq分析*MpigE*在红曲霉色素生物合成中的转录调控

倪峰，丁允章，马静静，王嘉琦，蒋冬花*

浙江师范大学化学与生命科学学院，浙江 金华 321004

摘要：【目的】分析 *MpigE* 的缺失在转录水平对红曲色素产生的影响。【方法】对实验室保存的野生型紫色红曲霉(*Monascus purpureus*) Mp-21 和△*MpigE* 菌株进行高通量转录组测序、注释、表达差异基因功能富集分析和基因通路富集分析，在转录水平揭示 *MpigE* 缺失后红曲霉色素产量变化的原因。【结果】通过 RNA-Seq 测序，每个样品获得 7.5–8.5 Gb 的原始数据，经过拼接后得到 7219 个转录本(Unigenes)，其中成功注释的为 5692 个。差异基因表达富集分析发现基因缺失菌株△*MpigE* 相较于野生型菌株 Mp-21 上调差异基因达到 199 个，下调差异基因为 293 个。【结论】*MpigE* 的缺失能够促进红曲霉中中央碳代谢和乙酰辅酶 A 代谢相关基因的表达以此影响色素生物合成。

关键词：红曲霉，红曲色素，基因缺失，代谢调控

红曲霉(*Monascus*)是一类重要的药用和食用丝状真菌[1]，由于其能够产生红曲色素(*Monascus* pigments，MPs)而作为重要的工业菌种在染料行业被广泛应用[2]，特别是在中国、日本等东亚国家。MPs 作为可以通过生物发酵获得的良好染色剂，因其染色效果好，在水和有机溶剂中均具有良好的溶解性及高度安全性，在食品行业中常作为食品染料使用。根据颜色红曲色素通常被分为三类，分别是红色素(MRPs)、橙色素(MOPs)和黄色素(MYPs)。野生型红曲霉中红色素的产量最高，按结构来说，黄色素的种类最为丰富[3–4]，且相较于红色素和橙色素具有更优异的抗光降解性、酸碱及热稳定性[5]。除了作为染料，部分醇溶性黄色素表现出了良好的抗癌活性[6–8]并具有治疗阿尔茨海默症[9]的应用前景。因此，MYPs 作为功能性膳食补充剂有较好的应用前景。但由于其生物合成和代谢途径尚未被完全探明[10]，从红曲霉中有效生产高纯度 MPs 的方法还需要进一步探究。

研究认为聚酮化合物合成酶(PKS)和脂肪酸合成酶(FAS)在红曲霉色素合成途径中发挥着重要作用[11]。近年来，已经有多个红曲霉色素合成

基金项目：国家自然科学基金(31570013，31270061)
*通信作者。E-mail：jdh@zjnu.cn
收稿日期：2020-05-26；**修回日期：**2020-06-28；**网络出版日期：**2020-12-11

相关基因被克隆和验证[12–14]。红曲霉色素合成相关基因家族包含至少 16 个基因，分别是 *MpigA* (非还原性聚酮合成酶，NR-PKS)、*MpigB* (转录因子)、*MpigC* (脱氢酶)、*MpigD* (3-O-转乙酰酶)、*MpigE* (脱氢酶)、*MpigF* (单胺氧化酶)、*MpigG* (氧化还原酶)、*MpigH* (脱氢酶)、*MpigI* (转录因子)、*MpigJ* (脂肪酸合酶，α 亚基)、*MpigK* (脂肪酸合酶，β 亚基)、*MpigL* (锚蛋白)、*MpigM* (P450-单加氧酶)、*MpigN/O* (单加氧酶)、*MpigP* (未知功能)和 *MpigQ* (转运蛋白)(图 1)。其中，*MpigE* 缺失能够导致红曲霉 MYPs 产量大幅度提高。Liu 等[15]发现 *ΔMpigE* 主要产生 4 种黄色素，其中橙色素的产生被完全抑制，但红色素的产生被部分抑制。Liu 等[16]的研究证明了 *MpigE* 的缺失能够影响色素形成必需中间体 M7PKS-1 的产量。Balakrishnan 等[17]研究发现 *MpigE* 作为聚酮途径中的还原酶控制着安卡红曲黄素和红曲色素的生物合成。因此在 MYPs 的形成中 *MpigE* 有着不可替代的作用。本研究通过对紫色红曲霉 Mp-21 及△*MpigE* 进行高通量转录组测序分析，以探讨 *MpigE* 基因在红曲霉色生物合成中的转录调控作用。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本实验室保存的野生紫色红曲霉菌株 Mp-21 和△*MpigE* 在 PDA 培养基中三轮活化后培养 7 d。

1.2 菌丝总 RNA 提取及 mRNA 文库构建

用 TaKaRa RNAiso Plus 提取试剂提取样品总 RNA，提取方法参照试剂说明书。提取的总 RNA 用 Qubit2.0 精确检测浓度，并用琼脂糖凝胶检测 RNA 完整性及基因组污染情况。检测合格后送往上海生工进行 RNA-seq 测序。样品取 3 个生物学重复。

1.3 基因注释与表达水平分析

利用 Trinity 方法[18]将 RNA-seq 得到的 reads 数据组经过组装、聚类、拼接步骤组装成转录本 (Transcript)。再将得到的转录本去冗余，取每个转录本聚类中最长的转录本为 Unigene。利用 NCBI BLAST+[19]和 KAAS (KEGG Automatic Annotation Server)[20]对其进行同源性比对，并将具有较高同源性的基因功能通过 Unigene 进行功能注释，比对数据库为 CDD(Conserved Domain Databas)[21]、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)[22]、COG (Clusters of Orthologous Groups

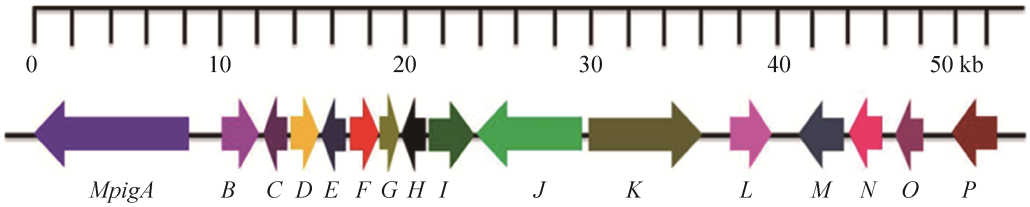

图 1. 红曲色素(MPs)合成代谢途径相关基因簇(53 kb，16 基因)

Figure 1. *Monascus* pigment (MPs) anabolic pathway related gene cluster (53 kb, 16 genes). The ruler at the top of the figure shows the relative size of genes in KB; Arrows show the direction of genes and transcription. *MpigA–MpigP* genes encoded respectively: A: polyketide synthase; B: positive regulator; C: dehydrogenase; D: 3-O-acetyltransferase; E: aryl alcohol dehydrogenase; F: amine oxidase; G: oxidoreductase; H: dehydrogenase; I: negative regulator; J: α-fatty acid synthase; K: β-fatty acid synthase; L: ankyrin repeat protein; M: p450 enzyme; N: salicylate hydroxylase; O: hypothetical protein; P: multidrug transporter.

of proteins)[23]、KOG (euKaryotic Ortholog Groups)、PFAM (protein family)[24]、NT (NCBI nucleotide sequences)、NR (NCBI non-redundant protein sequences)、Swiss-Prot、TrEMBL。通过对 reads 的计数来估计基因的表达水平，并利用 Salmon[25]软件计算样品 TPM (Transcript Per Million)，估算出基因表达水平。

1.4 表达差异基因的筛选与富集分析以及 KEGG 通路富集分析

根据 Mp-21 和△*MpigE* 相关基因差异表达情况，采用 DESeq 进行表达差异分析，并对表达差异分析结果构建火山图进行可视化，筛选条件为：*P* value<0.05 且差异倍数 Fold Change >2。

表达差异功能基因 GO (gene ontology)使用 topGO 进行富集分析。根据 KO 注释的结果与 Pathway 的联系，使用 clusterProfiler 软件进行 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)通路富集分析。

2 结果和分析

2.1 菌落生长形态以及色素产生情况

原始菌株 Mp-21 和△*MpigE* 在 PDA 培养基上培养 7 d 的菌落形态如图 2 所示，两个菌株的菌落大小基本一致，菌落形态变化主要出现在胞外色素产生过程中，相较于 Mp-21 菌落，△*MpigE* 菌落表面呈黄色，伴随着胞外红色素的消失，在菌落表面产生了大量的胞外黄色素。

2.2 RNA-Seq 数据质量分析

为比较 Mp-21 缺失 *MpigE* 前后的基因表达变化情况，采用 RNA-Seq 技术分析在 PDA 培养基上培养 7 d 后的 Mp-21 和△*MpigE* 样品的基因表达差异。样品 cDNA 经测序后，单个样品获得了

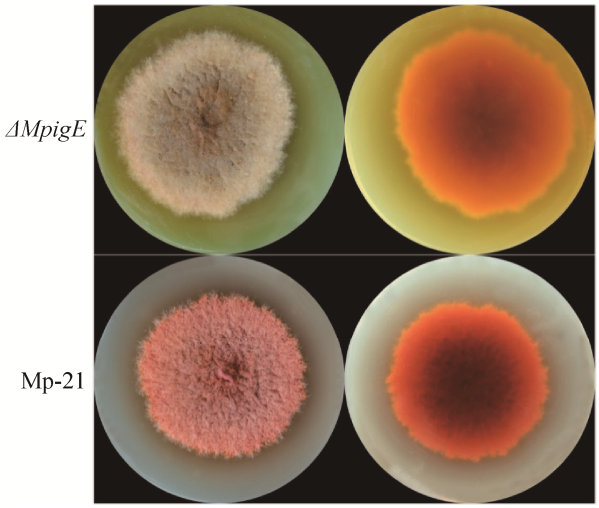

图 2. 在 PDA 培养基上培养 7 d 的 Mp-21 和△*MpigE* 菌落形态

Figure 2. Morphology of Mp-21 and △*MpigE* colonies cultured in PDA for 7 days.

7.5–8.5 Gb 的原始数据，Reads 数为 50.3–57.1 M，每个 Read 长度 150 bp。使用 Trimmomatic[26]软件处理后得到有效 Reads 数(精确度 90%以上) 46.1–52.8 M，Read 平均长度为 142–144 bp。将处理后数据通过 Trinity 组装成转录本，得到 Unigene 7219 个，全长 21 Mb，平均长度为 2985 bp。

如表 1 所示，Mp-21 三个样品的平均有效 reads 数为 46744934，精确度达到 99.9%以上比例为 96.03%；而△*MpigE* 三个样品的平均有效 reads 数为 50316365，精确度达到 99.9 以上比例为 96.03%。

2.3 转录 Unigenes 序列功能注释

为了对样品中转录本测序结果进行总体了解，将经过组装得到的 7219 个 Unigenes 在各个数据库中进行比对注释。结果如表 2 所示，最终将所得 Unigenes 进行功能注释，至少有一项注释的 Unigenes 有 5692 个，占总 Unigenes 的 78.85%，所有数据库中均注释成功的 Unigenes 为 885 个，占总 Unigenes 的 12.26%，具体注释情况见表 3。

表 1. Mp-21 和△*MpigE* RNA-Seq 数据组装结果统计

Table 1. Statistics of Mp-21 and △*MpigE* RNA-Seq data assembly results

Sample name	Mp-21	△*MpigE*
Total reads count	46744934	50316365
Total bases count/bp	6678684528	7249201626
Accuracy more than 90% base number/bp	6676973448	7247319820
Accuracy above 90% bases ratio/%	99.97	99.97
Accuracy more than 99% base number/bp	6609947449	7174495442
Accuracy above 99% bases ratio/%	98.97	98.97
Accuracy more than 99.9% base number/bp	6413223870	6960691980
Accuracy above 99.9% bases ratio/%	96.03	96.03
GC bases count/bp	3564594111	3879554452
GC bases ratio/%	53.38	53.51

表 2. Mp-21 和△*MpigE* 转录 Unigene 序列注释统计表

Table 2. Annotation statistics of Mp-21 and △*MpigE* transcription Unigene sequences

Database	Number of genes	Ratio/%
CDD	3822	52.94
KOG	3285	45.5
NR	4526	62.7
NT	3606	49.95
PFAM	3176	44
Swiss-Prot	4271	59.16
TrEMBL	4516	62.56
GO	4616	63.94
KEGG	1380	19.12
Total genes count	7219	100

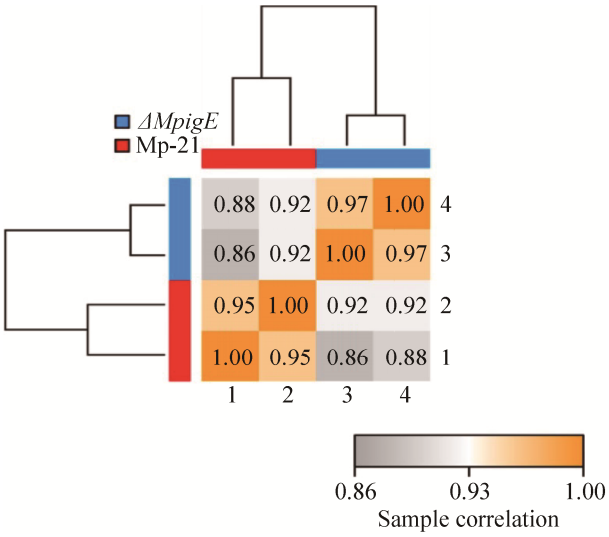

图 3. Mp-21 和△*MpigE* 基因表达水平相关性图

Figure 3. Correlation of Mp-21 and △*MpigE* gene expression levels.

2.4 样本生物学重复相关性检测

为了后续差异基因表达分析的准确性，首先需对样品进行基因表达水平相关性检测，其结果如图 3 所示，2 个样品的关系系数越接近 1，则表明样品之间表达模式的相似度越高。结果显示两个紫色红曲霉原始菌株 Mp-21 (1 和 2)的相关系数为 0.95，*MpigE* 缺失菌株△*MpigE* (3 和 4)的相关系数为 0.97，均具有较高的相关性，表明数据具有较高可信度；Mp-21 和△*MpigE* 的相关系数为 0.86–0.92，也具有一定的相关性，表明 *MpigE* 缺失对紫色红曲霉菌株整体基因表达影响较小，*MpigE* 基因为色素合成相关通路的基因，该基因的缺失影响范围较小。

2.5 差异表达基因统计

比较组表达差异火山图(图 4)横轴为基因在不同组样本间的表达差异倍数 fold-change[log(△*MpigE*/Mp-21)]值，纵轴为代表基因表达量变化

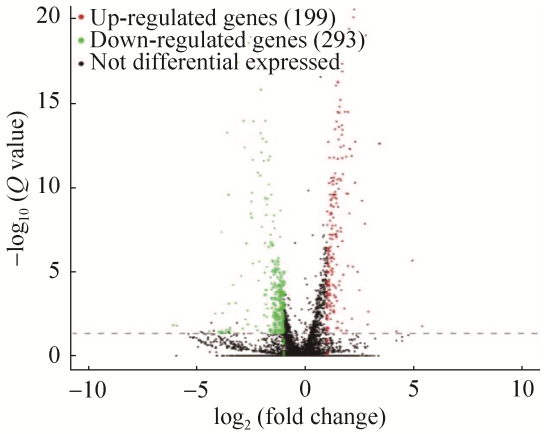

图 4. Mp-21 和△*MpigE* 差异基因表达火山图(△*MpigE vs.* Mp-21)

Figure 4. Volcano map of differential gene expression (△*MpigE vs*. Mp-21).

的统计学显著程度 *Q* value，*Q* value 越小，–log (*Q* value) 越大，差异越显著。如图所示，紫色红曲霉 *MpigE* 缺失前后的样品△*MpigE* 和 Mp-21 之间共有 492 个 Unigenes 的表达出现明显变化，其中上调的 Unigenes 数为 199 个，而下调 Unigenes 数为 293 个(图中每个点代表一个基因，其中红色表示上调基因，绿色表示下调基因，黑色表示非差异基因)。

2.6 差异表达基因 GO 分析

选出差异基因后，为了研究差异基因在注释功能中的分布状况，首先要阐明样本差异在基因功能上的体现，将差异表达基因进行 GO (gene ontology)分析。GO 注释分析能够将表达差异基因注释并分类到其标准化系统中的 3 个部分中，分别是生理过程相关(biological processes)、细胞组成相关(cellular components)和分子功能相关(molecular functions)。如图 5-A 所示，横轴为基因个数(下)及占被注释基因总数的比率(上)。浅色为差异基因，深色为所有基因。在代谢过程、细胞组成、细胞器组成、催化活性、蛋白结合等过程中具有超过 200 个基因发生了表达差异变化。其中表达量相对增量最多的 3 个基因分别是假定蛋白基因(TRINITY_DN1295_c0_g1)、钼酸盐转运蛋白基因(TRINITY_DN1464_c0_g3)、醛酮还原酶基因(TRINITY_DN1342_c2_g11)。下调最高的 3 个基因分别是未知基因(TRINITY_DN1367_c0_g5)、蛋白酶样蛋白基因(TRINITY_DN1173_c1_g3)和假定蛋白基因(TRINITY_DN588_c0_g1)。

对差异基因进行 GO 富集分析，设置校正后的 *P* 值(*Q* value)<0.05 为显著富集条件。结果如图 5-B 所示，在 *MpigE* 缺失前后样品中的差异基因表达只在催化活性和氧化还原酶活性两个方面存在富集现象。再将样品基因表达量上调与下调的数据分别进行 GO 富集分析，结果显示在上调基因中校正后 *P* 值(*Q* value)<0.05 的只有氧化还原酶活性相关基因，说明 *MpigE* 的缺失能够导致氧化还原酶相关基因表达显著上调，*MpigE* 本身表达后能够诱导氧化还原酶，*MpigE* 缺失后其他氧化还原酶相关基因表达量增加，说明在红曲霉中氧化还原酶系具有一定的同功性，当 *MpigE* 正常表达时，能够一定程度以竞争方式抑制其他的氧化还原酶基因表达，当 *MpigE* 缺失之后，其他氧化还原酶相关基因表达出现显著上调，从而替代 *MpigE* 表达蛋白酶的功能，但通过表型可以看出△*MpigE* 的色素产生与原始菌株存在较大差异，证明在色素合成相关途径中 *MpigE* 的功能相对独特，无法被其他氧化还原酶代替。同时，结果显示几个在催化活性和氧化还原酶活性方面富集的上调基因，在△*MpigE* 中表达量增加，并参与构成乙酰辅酶 A，这是红曲色素的形成前提。下调基因的富集结果显示，校正后的 *P* 值(*Q* value)<0.05 出现在两个方面，分别是 ARF 鸟苷酸交换因子活性和催化活性相关。此外在对表达量下调基因生

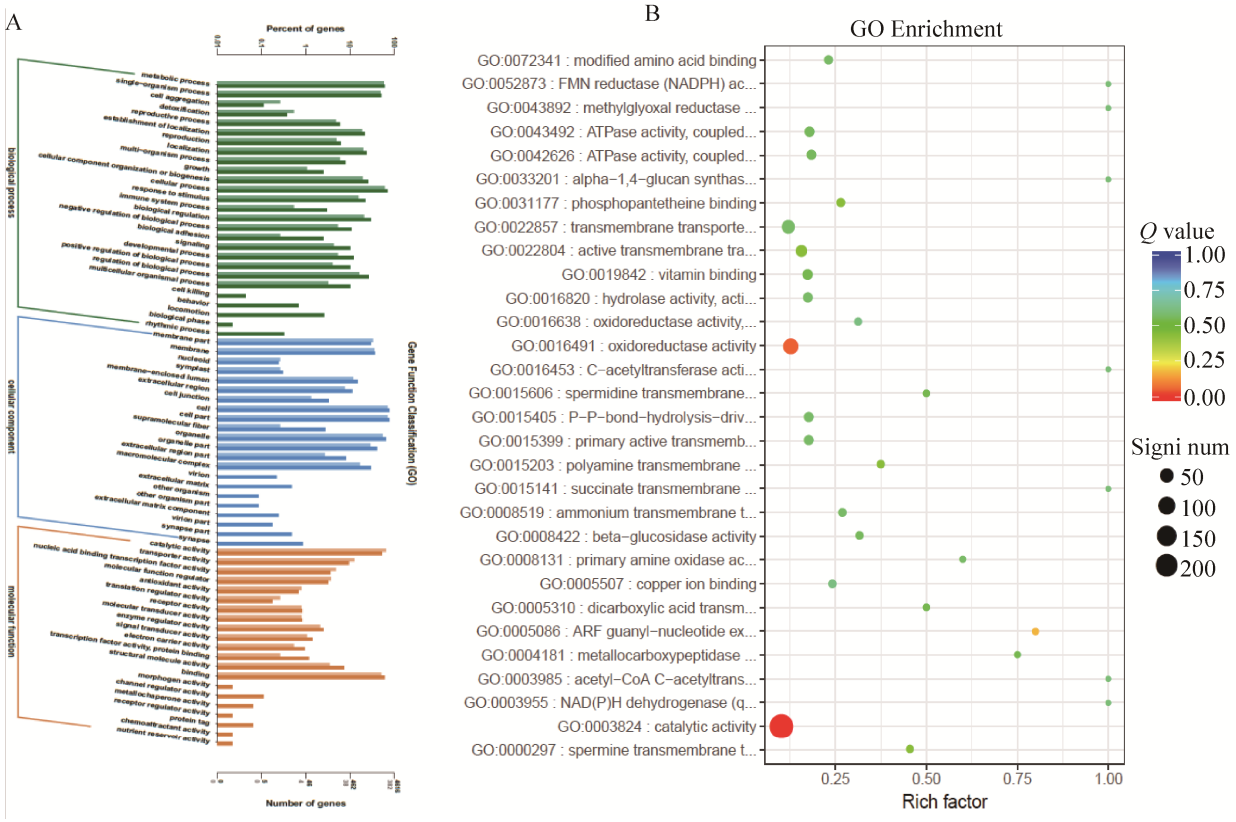

图 5. Mp-21 和△*MpigE* 差异表达基因 GO 分析

Figure 5. Go analysis of differential expression genes of Mp-21 and △*MpigE*. A: Annotation classification; B: Scatter diagram of go enrichment analysis.

理过程(BP)相关基因进行富集时，其碳水化合物代谢相关途径中的基因出现了明显富集，这表明 *MpigE* 的缺失导致了红曲霉中碳水化合物代谢相关催化基因表达量出现了明显下调。

对差异基因的GO数据库进行综合注释和富集分析，结果显示差异基因中上调基因富集程度最高的主要在氧化还原酶活性和胞醛代谢过程；而下调基因富集程度最高的主要在 ARF 鸟苷酸交换因子活性、催化活性、细胞壁组成和多糖代谢过程。

2.7 差异表达基因 KOG 注释与 KEGG 通路富集分析

MpigE 缺失前后的表达差异基因经过 KOG 注释显示共参与了 144 条通路，其中基因显著富集的通路有 13 条，按差异基因富集程度大小依次为淀粉和蔗糖代谢(starch and sucrose metabolism)、碳代谢(carbon metabolism)、丙酮酸代谢(pyruvate metabolism)、氰基胺基酸代谢(cyanoamino acid metabolism)、异喹啉生物碱的生物合成(isoquinoline alkaloid biosynthesis)、托烷、哌啶和吡啶生物碱的生物合成(tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis)、β-丙氨酸代谢(beta-alanine metabolism)、牛磺酸和亚牛磺酸代谢(taurine and hypotaurine metabolism)、酪氨酸代谢(tyrosine metabolism)、苯丙氨酸代谢(phenylalanine metabolism)、碳水化合物消化吸收(carbohydrate digestion and absorption)、蛋白质消化吸收(protein digestion and absorption)、苯丙醇生物合成(phenylpropanoid biosynthesis)等(表 3)。

表 3. Mp-21 和△*MpigE* 差异基因 KEGG 分析富集统计

Table 3. Analysis and enrichment statistics of differential gene KEGG of Mp-21 and △*MpigE*

Pathway	Differential genes	*P*-value	Gene ID	
			Up-regulated	Down-regulated
Starch and sucrose metabolism	10	5.81E-05	TRINITY_DN1257_c0_g2 TRINITY_DN1143_c2_g1 TRINITY_DN1450_c0_g1	TRINITY_DN483_c0_g1 TRINITY_DN1377_c0_g5 TRINITY_DN1531_c1_g2 TRINITY_DN1274_c0_g1 TRINITY_DN1333_c1_g2 TRINITY_DN1158_c3_g4 TRINITY_DN1345_c0_g1
Carbon metabolism	14	0.000567	TRINITY_DN1194_c4_g3 TRINITY_DN1332_c0_g1 TRINITY_DN1517_c2_g6 TRINITY_DN1286_c2_g5 TRINITY_DN1441_c1_g7 TRINITY_DN1487_c0_g3 TRINITY_DN1450_c0_g1 TRINITY_DN1305_c1_g1 TRINITY_DN1182_c2_g8 TRINITY_DN1072_c0_g1 TRINITY_DN1557_c0_g6	TRINITY_DN1323_c1_g3 TRINITY_DN1519_c3_g9 TRINITY_DN1345_c0_g1
Pyruvate metabolism	6	0.004956	TRINITY_DN1332_c0_g1 TRINITY_DN1090_c0_g1 TRINITY_DN1305_c1_g1 TRINITY_DN1438_c5_g4 TRINITY_DN1557_c0_g6	TRINITY_DN1323_c1_g3
Cyanoamino acid metabolism	4	0.005647	TRINITY_DN1143_c2_g1	TRINITY_DN1274_c0_g1 TRINITY_DN988_c0_g1 TRINITY_DN1369_c2_g1
Isoquinoline alkaloid biosynthesis	3	0.006338	TRINITY_DN1209_c0_g1	TRINITY_DN452_c0_g1 TRINITY_DN847_c0_g1
Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	3	0.006338	TRINITY_DN1209_c0_g1	TRINITY_DN452_c0_g1 TRINITY_DN847_c0_g1
Beta-alanine metabolism	5	0.010864	TRINITY_DN1441_c1_g7 TRINITY_DN1209_c0_g1	TRINITY_DN1271_c2_g2 TRINITY_DN452_c0_g1 TRINITY_DN847_c0_g1
Taurine and hypotaurine metabolism	3	0.011841	–	TRINITY_DN1380_c1_g4 TRINITY_DN1271_c2_g2 TRINITY_DN1369_c2_g1
Tyrosine metabolism	4	0.01789	TRINITY_DN1209_c0_g1	TRINITY_DN1515_c3_g1 TRINITY_DN452_c0_g1 TRINITY_DN847_c0_g1
Phenylalanine metabolism	4	0.01789	TRINITY_DN1209_c0_g1	TRINITY_DN1465_c5_g1 TRINITY_DN452_c0_g1 TRINITY_DN847_c0_g1
Carbohydrate digestion and absorption	3	0.028956	TRINITY_DN1257_c0_g2	TRINITY_DN1249_c0_g3 TRINITY_DN1345_c0_g1
Protein digestion and absorption	4	0.031378	–	TRINITY_DN1249_c0_g3 TRINITY_DN302_c0_g1 TRINITY_DN710_c0_g1 TRINITY_DN638_c0_g1
Phenylpropanoid biosynthesis	2	0.043247	TRINITY_DN1143_c2_g1	TRINITY_DN1274_c0_g1

从得到的 13 条通路可以看出，富集程度最高的通路分别是淀粉和蔗糖代谢与碳代谢通路。淀粉和蔗糖是重要的能源物质，同时也是红曲色素次级代谢途径中重要的影响因素，在此之前，大部分研究显示不同的碳源会导致发酵液中红曲色素的种类和产量有较大的改变。KEGG 分析结果显示在淀粉和蔗糖代谢通路中一共有 27 个基因被注释，10 个基因表达量发生明显变化。其中淀粉代谢相关α淀粉酶基因(TRINITY_DN1257_c0_g2)等 3 个基因出现了明显上调，果胶裂解酶基因(TRINITY_DN483_c0_g1)、纤维素酶基因(TRINITY_DN1377_c0_g5)等 7 个其他多糖降解途径的基因表达量表现出下调的结果。同时，海藻糖合酶表达下调(TRINITY_DN1531_c1_g2)，表明可能△*MpigE* 相较于 Mp-21 更适合 PDA 培养基，许多真菌能够在逆境条件下通过提高海藻糖合酶的表达增加海藻糖的合成量以抵御外界恶劣环境。转录结果显示 *MpigE* 的缺失可能会导致菌株更偏好淀粉作为碳源，从而提高了淀粉消化相关基因的表达。

MpigE 的缺失也导致了红曲霉细胞碳代谢相关基因表达发生明显的变化。NAD(P)H 是一类重要的中间物质，与糖类的代谢有密不可分的关系，而 *MpigE* 表达的产物是一类 NAD(P)H 依赖型氧化还原酶，需要以分解 NAD(P)H 作为条件进行催化，*MpigE* 的缺失可能通过影响 NAD(P)H 的消耗速率从而改变碳代谢相关基因的表达。KEGG 分析结果显示在碳代谢通路中有 60 个基因被注释，14 个基因表达量发生明显变化，其中 11 个基因表达量明显上调，3 个基因表达量发生明显下调。

与此同时 *MpigE* 的缺失也导致了与乙酰辅酶 A 相关的代谢反应出现明显的转录变化(图 6)。乙酰辅酶 A 是参与碳代谢和能量代谢的重要代谢产物，在红曲霉中也是色素生物合成的最重要底物。在此前的研究中发现与 Mp-21 相比，△*MpigE* 在培养 7 d 后色素总产量是 Mp-21 的 2 倍甚至更多。因此，在 *MpigE* 缺失之后，菌株需要更多的乙酰辅酶 A 才能在更多红曲色素合成的同时进行正常的中心能量代谢。在生物体内，乙酰辅酶 A 主要依赖丙酮酸激酶催化丙酮酸转化成乙酰辅酶 A，而在转录组数据中显示，丙酮酸脱氢酶基因(TRINITY_DN1305_c1_g1)在 *MpigE* 缺失之后出现了明显的上调，证明有更多丙酮酸脱氢酶表达参与到该途径中以提高乙酰辅酶 A 的产量。同时，与 Mp-21 相比，△*MpigE* 中乙酰辅酶 A 产量的增加表示在△*MpigE* 中需要更多的丙酮酸，丙酮酸在生物体内主要通过糖酵解途径中的磷酸烯醇式丙酮酸转化得到，同时也能由乳酸、苹果酸和丙氨酸转化产生。

在转录组差异表达数据中发现，许多与丙酮酸代谢相关的基因发生了明显上调，例如磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶基因(TRINITY_DN1332_c0_g1)、乳酸氧化酶 FCB2 基因(TRINITY_DN1438_c5_g4)、苹果酸合成酶 A 基因(TRINITY_DN1557_c0_g6)；磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶能够在糖异生途径中催化草酰乙酸形成磷酸烯醇式丙酮酸和二氧化碳。乳酸氧化酶 FCB2 是一种呼吸酶，位于真菌线粒体的膜间隙中，它能够催化 L-乳酸氧化为丙酮酸；苹果酸合成酶 A 催化乙醛酸和乙酰辅酶 A 反应生成苹果酸和辅酶 A。转录组数据显示在△*MpigE* 中，虽然丙酮酸脱氢酶基因存在明显上调，但是控制糖酵解途径中葡萄糖磷酸化反应催化酶-己糖激酶合成基因(TRINITY_DN1345_c0_g1)表达量下调了将近 3 倍，

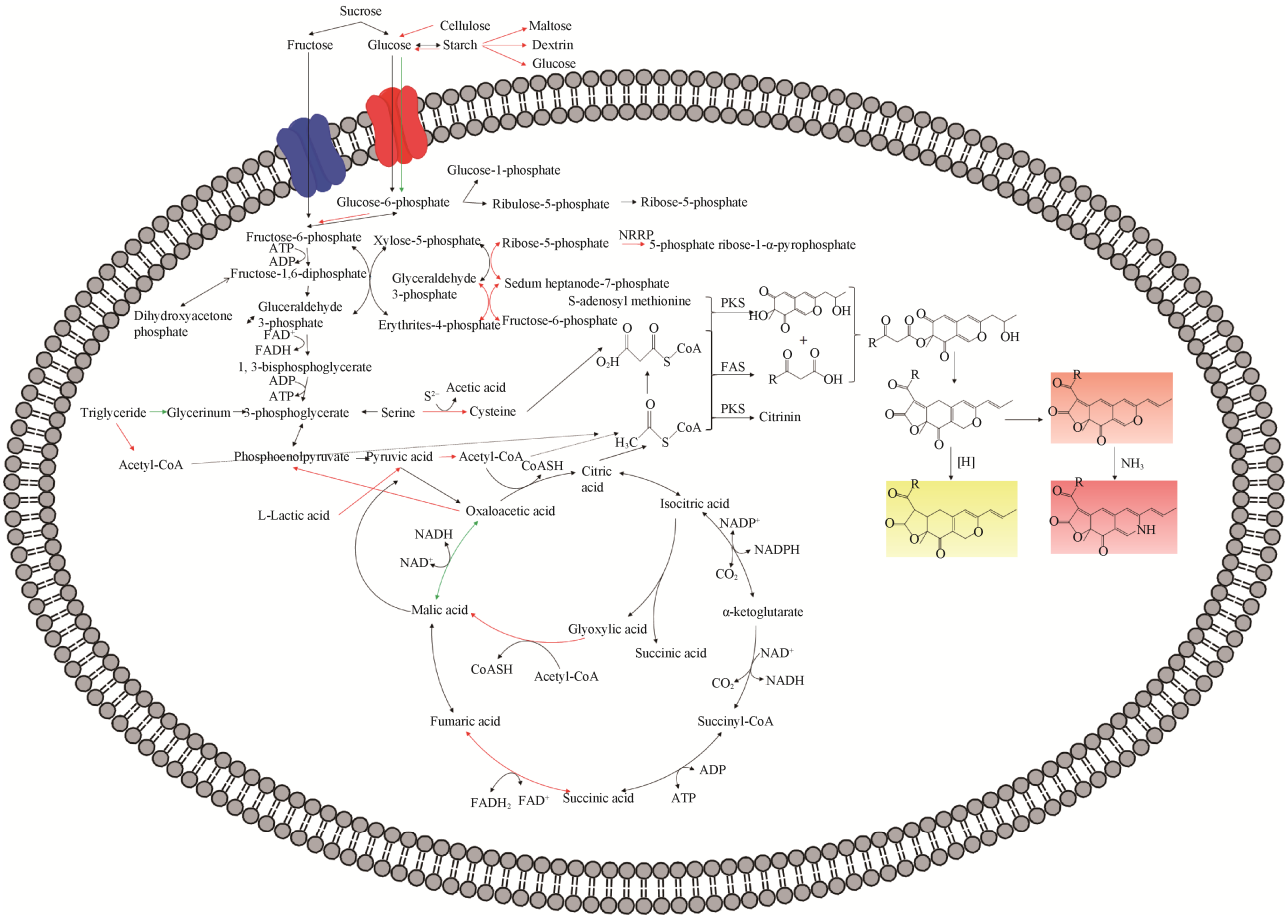

图 6. *MpigE* 缺失后红曲霉色素代谢相关通路变化图

Figure 6. Changes of *Monascus* pigment metabolism related pathway after *MpigE* gene deletion. Red arrow indicates up-regulated genes, green arrow indicates down-regulated genes.

同时催化 D-葡萄糖-6-磷酸盐和 D-果糖-6-磷酸盐之间转换的葡萄糖-6-磷酸异构酶基因(TRINITY_DN1450_c0_g1)表达量上调了大约 3 倍，催化嘌呤核苷酸生物合成第一步反应的磷酸戊糖焦磷酸激酶基因(TRINITY_DN1194_c4_g3)表达量上调了大约 2 倍，这表明 *MpigE* 的缺失可能间接导致了菌株葡萄糖磷酸化反应强度的降低以及糖异生途径的增加。

3 讨论

在之前的研究中发现，*MpigE* 的缺失能够导致红曲霉菌株在 PDA 培养基中失去产生红色素的能力[27]，并且有大量新的黄色素产生。在本次研究中，我们通过高通量测序技术获得了紫色红曲霉 Mp-21 与△*MpigE* 的转录组序列并进行比较，从转录角度分析 *MpigE* 的缺失对于紫色红曲霉的影响，这对于红曲霉转录与其代谢相关的研究有显著的推进作用，也为红曲霉资源的进一步开发提供理论依据。

转录组数据显示，*MpigE* 的缺失干扰了 Mp-21 的中央碳代谢和乙酰辅酶 A 代谢相关基因表达以此来影响色素生物合成。首先，*MpigE* 的缺失可

能直接或间接提高了菌株中淀粉消化酶的表达使菌株获得更高的淀粉利用率，提高了菌株中碳代谢效率并使菌株更偏好淀粉作为碳源。同时，*MpigE* 缺失后转录水平改变最大的是与乙酰辅酶 A 代谢相关通路中的基因，其中绝大多数基因表达的改变都是有助于产生更多的乙酰辅酶 A，并在代谢产物中提高了色素产量，这与之前的报道一致，红曲霉色素产量的提高必然伴随着更多的乙酰辅酶 A 的产生。

此外，转录组结果显示 *MpigE* 缺失后其他的氧化还原酶基因的表达量显著上调，说明 *MpigE* 表达的氧化还原酶在红曲霉体内可能存在功能相似的酶，在△*MpigE* 中相关基因表达量上调以弥补 *MpigE* 表达产物的功能，但是在色素形成方面，*MpigE* 的功能是唯一的，导致了△*MpigE* 在色素表现上与原始菌株完全不同，只能产生黄色素。

参 考 文 献

[1] Zhang JZ. Microbial taxonomy. Shanghai: Fudan University Press, 1990: 178–179. (in Chinese)
张纪忠. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1990: 178–179.

[2] Clement A. 一株紫色红曲霉液态发酵产红曲色素的特性研究. 西北师范大学硕士学位论文, 2019: 1–20.

[3] Wang TH, Lin TF. *Monascus* rice products. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2007, 53: 123–159.

[4] Mondal S, Pandit SG, Puttananjaiah MH, Harohally NV, Dhale MA. Structural and functional characterization of new pigment molecule Monashin from *Monascus purpureus* CFR410-11. *Process Biochemistry*, 2019, 82: 173–178.

[5] Su NW, Lin YL, Lee MH, Ho CY. Ankaflavin from *Monascus*-fermented red rice exhibits selective cytotoxic effect and induces cell death on Hep G2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(6): 1949–1954.

[6] Akihisa T, Tokuda H, Ukiya M, Kiyota A, Yasukawa K, Sakamoto N, Kimura Y, Suzuki T, Takayasu J, Nishino H. Anti-tumor-initiating effects of monascin, an azaphilonoid pigment from the extract of *Monascus pilosus* fermented rice (red-mold rice). *Chemistry & Biodiversity*, 2005, 2(10): 1305–1309.

[7] Hsu LC, Hsu YW, Liang YH, Liaw CC, Kuo YH, Pan TM. Induction of apoptosis in human breast adenocarcinoma cells MCF-7 by monapurpyridine A, a new azaphilone derivative from *Monascus purpureus* NTU 568. *Molecules* (*Basel*, *Switzerland*), 2012, 17(1): 664–673.

[8] [8] Shi YC, Pan TM, Liao VHC. Monascin from *Monascus*-fermented products reduces oxidative stress and amyloid-β toxicity via DAF-16/FOXO in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(38): 7114–7120.

[9] 郝雪言. 红花黄色素对 Tau 蛋白过度磷酸化所致阿尔兹海默症的保护作用研究. 烟台大学硕士学位论文, 2018: 1–25.

[10] Chen WP, He Y, Zhou YX, Shao YC, Feng YL, Li M, Chen FS. Edible filamentous fungi from the species *Monascus*: early traditional fermentations, modern molecular biology, and future genomics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2015, 14(5): 555–567.

[11] Hajjaj H, Klaébé A, Loret MO, Goma G, Blanc PJ, François J. Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *Monascus ruber* as revealed by ^{13}C nuclear magnetic resonance. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(1): 311–314.

[12] Yang Y, Liu B, Du XJ, Li P, Liang B, Cheng XZ, Du LC, Huang D, Wang L, Wang S. Complete genome sequence and transcriptomics analyses reveal pigment biosynthesis and regulatory mechanisms in an industrial strain, *Monascus purpureus* YY-1. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8331.

[13] Balakrishnan B, Karki S, Chiu SH, Kim HJ, Suh JW, Nam B, Yoon YM, Chen CC, Kwon HJ. Genetic localization and *in vivo* characterization of a *Monascus* azaphilone pigment biosynthetic gene cluster. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(14): 6337–6345.

[14] Chen WP, Chen RF, Liu QP, He Y, He K, Ding XL, Kang LJ, Guo XX, Xie NN, Zhou YX, Lu YY, Cox RJ, Molnár I, Li M, Shao YC, Chen FS. Orange, red, yellow: biosynthesis of azaphilone pigments in *Monascus* fungi. *Chemical Science*, 2017, 8(7): 4917–4925.

[15] Liu QP, Xie NN, He Y, Wang Li, Shao YC, Zhao HZ, Chen FS. *MpigE*, a gene involved in pigment biosynthesis in

Monascus ruber M7. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(1): 285–296.

[16] Liu J, Zhou YX, Yi T, Zhao MM, Xie NN, Lei M, Liu QP, Shao YC, Chen FS. Identification and role analysis of an intermediate produced by a polygenic mutant of *Monascus* pigments cluster in *Monascus ruber* M7. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(16): 7037–7049.

[17] Balakrishnan B, Park SH, Kwon HJ. A reductase gene *mppE* controls yellow component production in azaphilone polyketide pathway of *Monascus*. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(1): 163–169.

[18] Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, Couger MB, Eccles D, Li B, Lieber M, MacManes MD, Ott M, Orvis J, Pochet N, Strozzi F, Weeks N, Westerman R, William T, Dewey CN, Henschel R, LeDuc RD, Friedman N, Regev A. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 2013, 8(8): 1494–1512.

[19] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389–3402.

[20] Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(S2): W182–W185.

[21] Marchler-Bauer A, Zheng CJ, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Lu SN, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Zhang DC, Bryant SH. CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1): D348–D352.

[22] Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 27–30.

[23] Tatusov RL, Galperin MY, Natale DA, Koonin EV. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 33–36.

[24] Finn RD, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, Potter SC, Punta M, Qureshi M, Sangrador-Vegas A, Salazar GA, Tate J, Bateman A. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): D279–D285.

[25] Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*, 2017, 14(4): 417–419.

[26] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114–2120.

[27] Wang JQ, Zhang Q, Jiang B, Lv MX, Jiang DH. Deletion of *PigE*, a pigment biosynthesis-related gene, upregulates the varieties and yields of yellow pigments in *Monascus purpureus* Mp-21. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(8): 1547–1560. (in Chinese)
王嘉琦, 张琪, 江北, 吕梦霞, 蒋冬花. 色素生物合成相关 PigE 基因的缺失对紫色红曲霉 Mp-21 黄色素种类和产量的影响. 微生物学报, 2019, 59(8): 1547–1560.

Unraveling *MpigE* involved in pigment biosynthesis in *Monascus purpureus* Mp-21 by RNA-Seq transcriptome profiling analyses

Feng Ni, Yunzhang Ding, Jingjing Ma, Jiaqi Wang, Donghua Jiang*

College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang Province, China

Abstract: [Objective] To analyze the effect of *MpigE* (one of *Monascus purpureus* genes) deletion on the transcription of *Monascus* pigments. **[Methods]** The wild-type *Monascus purpureus* Mp-21 and the *ΔMpigE* were analyzed by high-throughput transcriptome sequencing, annotation, enrichment of gene function analysis and gene expression differences pathway enrichment analysis. The transcription level revealed the reason for the change of pigment production after *MpigE* deletion. **[Results]** By RNA-seq sequencing, 7.5–8.5Gb of original data were obtained from each sample, and 7219 Unigenes were obtained after de novo assembly, among which 5692 were successfully annotated. The enrichment analysis of differentially expressed genes showed that compared with the wild-type strain of Mp-21, *ΔMpigE* had 199 up-regulated differentially expressed genes and 293 down-regulated differentially expressed genes. **[Conclusion]** The deletion of *MpigE* can affect the biosynthesis of pigment by promoting the expression of central carbon metabolism and acetyl-CoA metabolism-related genes in *Monascus*.

Keywords: *Monascus*, *Monascus* pigments, gene deletion, metabolic regulation

（本文责编：李磊）

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31570013, 31270061)

*Corresponding author. E-mail: jdh@zjnu.cn

Received: 26 May 2020; Revised: 28 June 2020; Published online: 11 December 2020