



里氏木霉翻转酶 DRS2 对木质纤维素降解酶基因表达及分泌的影响

杨鑫^{1,2}, 何若男^{1,2}, 江贤章^{1,2}, 刘晓东^{1,2}, 秦丽娜^{1,2*}

1 福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350000

2 工业微生物发酵技术国家地方联合工程研究中心, 福建 福州 350000

杨鑫, 何若男, 江贤章, 刘晓东, 秦丽娜. 里氏木霉翻转酶 DRS2 对木质纤维素降解酶基因表达及分泌的影响. 微生物学报, 2022, 62(4): 1549–1562.

Yang Xin, He Ruonan, Jiang Xianzhang, Liu Xiaodong, Qin Lina. Effects of flippase DRS2 on expression and secretion of lignocellulases in *Trichoderma reesei*. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(4): 1549–1562.

摘要:【目的】本研究以工业生产菌株里氏木霉为研究对象, 鉴定翻转酶基因 *drs2* 对其纤维素酶表达及分泌的影响。【方法】首先通过 BLAST 序列比对, 从里氏木霉中鉴定出翻转酶基因 *drs2*, 并通过同源重组的方法在里氏木霉中构建了 *drs2* 基因的敲除菌株 $\Delta drs2$ 。对 $\Delta drs2$ 菌株及其对照株在不同碳源上的生长发育、蛋白分泌、纤维素酶及半纤维素酶的表达水平等进行比较分析, 并对 DRS2 蛋白进行了亚细胞定位。【结果】与对照菌株 *Cpyr4* 相比, $\Delta drs2$ 菌株在葡萄糖、乳糖、微晶纤维素(avicel)等条件下生长速率都明显降低。 $\Delta drs2$ 菌株在纤维素诱导条件下的总蛋白分泌量、纤维素酶活力、半纤维素酶活力均显著提高, 但 *drs2* 基因的缺失并不影响关键纤维素酶基因的转录水平。DRS2 蛋白位于里氏木霉菌丝近顶端的顶体位置。【结论】在纤维素为唯一碳源条件下, *drs2* 基因的缺失导致纤维素酶的产量显著提高, *drs2* 基因不调控纤维素酶基因的转录, 而是在其分泌过程中发挥作用。

关键词: 里氏木霉; 翻转酶; 纤维素酶; 蛋白分泌; 基因敲除

基金项目: 国家自然科学基金(31800060); 福建省自然科学基金(2019I0009, 2020J01177)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31800060) and by the Natural Science Foundation of Fujian Province in China (2019I0009, 2020J01177)

*Corresponding author. E-mail: qinln@fjnu.edu.cn

Received: 27 October 2021; Revised: 10 January 2022; Published online: 18 January 2022

Effects of flippase DRS2 on expression and secretion of lignocellulases in *Trichoderma reesei*

YANG Xin^{1,2}, HE Ruonan^{1,2}, JIANG Xianzhang^{1,2}, LIU Xiaodong^{1,2}, QIN Lina^{1,2*}

1 College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350000, Fujian, China

2 National and Local Joint Engineering Research Center for Industrial Microbial Fermentation Technology, Fuzhou 350000, Fujian, China

Abstract: [Objective] To study the effects of flippase DRS2 on the expression and secretion of lignocellulases in *Trichoderma reesei*. [Methods] The homologous gene *drs2* in *T. reesei* was firstly identified through sequence alignment by BLAST and then deleted via homologous recombination strategy from *T. reesei*. The growth, protein secretion, and activities of cellulase and hemicellulase were compared between the *drs2*-deleted strain $\Delta drs2$ and the control strain *Cpyr4*. Furthermore, the subcellular localization of DRS2 was predicted. [Results] Compared with *Cpyr4*, $\Delta drs2$ showed significantly decreased growth rate in the medium supplemented with glucose, lactose or microcrystalline cellulose (avicel). The total protein secretion and the activities of cellulase and hemicellulase of $\Delta drs2$ were significantly higher than those of *Cpyr4*. The transcriptional levels of the key cellulase genes were similar between $\Delta drs2$ and *Cpyr4*. Subcellular localization prediction revealed that DRS2 was located in Spitzenkörper of the hypha tip. [Conclusion] The deletion of *drs2* gene can significantly improve the production of lignocellulases in *T. reesei* cultured with cellulose as the sole carbon source. DRS2 may play a role in the secretion rather than the transcription of cellulases.

Keywords: *Trichoderma reesei*; flippase; cellulase; protein secretion; gene deletion

里氏木霉(*Trichoderma reesei*)作为自然界木质纤维素的主要分解者之一,具有生长快、繁殖力强和生物安全性好等优点。鉴于某些突变株的蛋白分泌量可达 100 g/L^[1-2],里氏木霉常被开发为工业酶制剂以及重组蛋白的生产菌株,广泛应用于食品、饲料和纺织等行业^[3-5]。利用分子生物学手段对里氏木霉中的未知功能基因进行功能鉴定,并在此基础上对其进行理性的遗传改造,开发可用于高效分泌表达蛋白的里氏木霉优秀宿主具有非常广泛的理论和应用研究价值。

翻转酶是位于细胞膜上的脂质转运蛋白,参与将脂质从外质膜面转移至胞质面。近期有研究发现,翻转酶基因 *drs-2* (NCU00352)的敲除可导致粗糙脉孢霉(*Neurospora crassa*)胞外

蛋白产量增加近 3 倍,说明翻转酶与胞外蛋白的表达分泌存在某些关联^[6]。在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,翻转酶 Drs2p 主要作用于反式高尔基体至早期内体之间的囊泡运输,与蛋白分泌的关系为正相关^[7-8]。然而,Drs2p 的同源基因 *drs-2* 在粗糙脉孢霉中的缺失非但没有阻碍蛋白分泌,反而增加了蛋白的分泌量,因此翻转酶在丝状真菌中可能存在着与酿酒酵母不同的作用机制。

里氏木霉与粗糙脉孢霉均为丝状真菌,在遗传进化距离上较为接近,*drs2* 基因对里氏木霉中纤维素酶的表达分泌是否也具有与粗糙脉孢霉相同的影响,尚未见报道。因此,在本研究中通过同源重组的方式对里氏木霉 *Tu6 $\Delta ku70$* 菌株的 *drs2* 基因进行敲除,研究其对纤维素酶

表达调控的影响, 并对其影响机制进行了初步探讨。本研究为遗传改良里氏木霉菌株, 进一步提高其纤维素酶以及重组蛋白的表达分泌水平提供了新的切入点。

1 材料与方法

1.1 出发菌株和培养基

实验所用里氏木霉野生型菌株 *QM6a* 从美国模式培养物研究所(American Type Culture Collection, ATCC)购买, 菌种编号为: 13631。里氏木霉尿苷营养缺陷型菌株 *Tu6Δku70* 由奥地利国家技术研究院 Monika Schmoll 惠赠。PDA 培养基, 用于菌丝生长、产孢量统计(g/L): 土豆 200 (煮成泥后过滤得上清), 葡萄糖 20, 定容至 1 L, 琼脂 20, 115 °C 灭菌 20 min 后常温保存。MM 培养基, 用于菌株发酵(g/L): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.003 7, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 0, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 4, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.001 6, KH_2PO_4 15, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5。LB 培养基, 用于大肠杆菌培养(g/L): NaCl 10, 胰蛋白胨 10, 酵母浸粉 5。

1.2 DRS2 蛋白生物信息学分析

在 NCBI 数据库中使用 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 在线软件工具, 通过粗糙脉孢霉的 DRS-2 (XP_957823.1) 氨基酸序列比对出里氏木霉(*T. reesei*, XP_006961068.1)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*, XP_663716.1)、酿酒酵母(*S. cerevisiae*, NP_009376.2)、黑曲霉(*A. niger*, XP_001395519.1) 等真菌的翻转酶氨基酸序列。使用 MEGA 4.0 在线软件中的 ClustalW 功能对以上翻转酶氨基酸序列进行多重比对, 然后通过 maximum likelihood 法构建进化树, 并通过 SMART 在线软件预测里氏木霉、粗糙脉孢霉和酿酒酵母 3 种真菌的翻转酶蛋白功能结构域。

1.3 里氏木霉 *drs2* 基因敲除菌株 Δdrs2 的构建

本研究所使用引物序列见表 1, 引物由福州尚亚生物技术有限公司合成。利用同源重组技术构建突变体, 以里氏木霉野生型菌株 *QM6a* 基因组为模板, 使用引物 P1-F 和 P1-R 扩增 *drs2* 基因上游 5'UTR 同源臂, 使用 P2-F 和 P2-R 引物扩增里氏木霉乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶基因 *pyr4* 作为筛选标记, 使用引物 P3-F 和 P3-R 扩增 *drs2* 基因下游 3'UTR 同源臂, 使用引物 P4-F 和 P4-R 扩增 pBluescript II SK(+) 含 Amp 筛选标记的载体骨架片段。利用 Gibson 克隆获得敲除载体 pDRS2。通过 PCR 将 pDRS2 载体的同源重组片段线性化, 利用纤维素酶与蜗牛酶制备里氏木霉菌丝原生质体, 随后在钙离子的帮助下, 引导重组片段转化进入利用 PEG4000 脱水处理后的里氏木霉 *Tu6Δku70* 原生质体中。待转化子长出后, 提取基因组进行 PCR 验证, 使用引物 Pk-F 与 Py-R 用于验证 *pyr4* 基因是否整合到基因组特定位点, 使用引物 Pk-F 与 Pd-R, 用于验证 *drs2* 基因是否被完全敲除。同时将 *pyr4* 基因表达盒随机整合到 *Tu6Δku70* 的基因组中, 构建尿苷营养缺陷型互补菌株, 所产生的互补菌株命名为 *Cpyr4* 作为对照^[9]。

1.4 里氏木霉 Δdrs2 菌株单核孢子富集和分离

里氏木霉的细胞是多核的, 为保证实验结果的准确性, 进行转化子的表型鉴定时统一采用同核体菌株进行实验, 因此在获得转化子后要同核体筛选。将获得的里氏木霉 Δdrs2 杂核转化子接种到单蒸水添加 2% 琼脂的平板上, 使得里氏木霉在营养缺乏的条件下更倾向于产生单核孢子, 利于后续同核体菌株的获得。28 °C 培养 5–7 d 后用无菌水将平板

表 1 本研究中所使用的引物

Table 1 PCR primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Characteristics
P1-F	CTATAGGGAGACCGGCAGCGGCCCTCCAAGGTGTTGGGGATCGTG	For 5'UTR of
P1-R	GATACCCGATATTGCGACTTTGGGGGCCGGAGGACGAGCAGTGGTTAG	<i>Δdrs2</i>
P2-F	CTAACCCTGCTCGTCTCCGGCCCCAAAGTCGCAATATCGGGTATC	For <i>T. reesei pyr4</i>
P2-R	CAATTTTTTCTTTGCTTTTTCAACTGCATCCAACCATCCTAC	
P3-F	GTAGGATGGTTGGATGCAGTTGAAAAAGCAAAGAAAAAATTG	For 3'UTR of
P3-R	GAAAATTGGAGCACTGCGAGGGCCTTTGGTGTGAAGAGGGGAGG	<i>Δdrs2</i>
P4-F	CCTCCCCTCTTACACCAAAGGCCCTCGCAGTGCTCCAATTTTC	For backbone
P4-R	CGATCCCCAACACCTTGGAGGCGGCCGCTGCCGGTCTCCCTATAG	
Pk-F	TGTACATGTTGAGCTATGAC	For genotypic
Pk-R	CAATGATACGGACCTTATCTC	analysis
Py-R	GAGATGGCACAATTCTGCTGTG	
Pd-R	CCAGGTCGTCGTCATTGAG	
Pm-F	GACTCCAAGCTGGACATCACC	
P5-F	CGACCTATAGACGGGATAGGTGGCTCCGGTGGCTCCGGTGGCTCCGTGAGCAAGG GCGAGGA	For <i>gfp</i>
P5-R	CAATTTTTTCTTTGCTTTTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATG	
P6-F	CATGGACGAGCTGTACAAGTAAAAAAGCAAAGAAAAAATTG	For backbone
P6-R	GATCCCCAACACCTTGGAGGCGGCCGCTGCCGGTCTCCCTATAG	
P7-F	CTATAGGGAGACCGGCAGCGGCCCTCCAAGGTGTTGGGGATC	
P7-R	TCCTCGCCCTTGCTCACGGAGCCACCGGAGCCACCGGAGCCACCTATCCCGTCTAT AGGTCG	
Tcbh1-RT-F	GCGCTCGCCTTTACCTTATG	For qRT-PCR
Tcbh1-RT-R	CAGCTGGGAGCCAACAAGAA	
Tcbh2-RT-F	ACTCTATTGCCGATGGTGGC	
Tcbh2-RT-R	GGCACACTTTGGAGTACCGA	
Tegl1-RT-F	CCCTCAACACTAGCCACCAG	
Tegl1-RT-R	AGGTCTTGGAGGTGTCAACG	
Tbgl1-RT-F	CTGTACATCACCTACCCATC	
Tbgl1-RT-R	TAGCTGAGATCTCGTCGTC	

上的孢子洗下,计数后在添加 2%葡萄糖以及 0.1% Triton 的 MM 培养基平板上稀释涂板, 28 °C 培养 3–6 d。将平板上长出的单菌落挑取到 PDA 平板上 28 °C 培养 5–7 d。待产孢后对基因组 DNA 进行提取及 PCR 验证,以基因组 DNA 为模板,以 Pk-F 与 Py-R 为外部引物, Pk-F 与 Pd-R 为内部引物,选取外部引物有条带而内部引物无条带的菌株,即为阳性同核体菌株。

1.5 里氏木霉 *Δdrs2* 菌株生长速率测定

里氏木霉 *Cpyr4* 对照株与里氏木霉 *Δdrs2*

菌株在 PDA 平板 28 °C 培养 7 d 后,制备孢子悬液,分别接种 1 μL 2×10^6 /mL 的孢子悬液于分别补加 2%葡萄糖和乳糖或 1% avicel 的 3 种 MM 培养基平板(直径 90 mm)中央,每 24 h 记录 1 次菌落直径,一共记录 6 d,计算 6 d 的平均生长速率。

1.6 里氏木霉 *Δdrs2* 菌株蛋白含量测定

1.6.1 蛋白含量测定

采用 Bradford 法(Bio-Rad protein assay)测定各发酵上清液中的蛋白浓度,按照说明书(Bio-Rad, USA)进行操作,以牛血清蛋白标准

蛋白液绘制标准曲线, 计算蛋白浓度。

1.6.2 胞内蛋白含量测定

取1 mL发酵液到1.5 mL离心管中, 10 000 r/min离心5 min, 去掉上清液, 加入400 μ L裂解液(0.001 mol/L EDTA、0.05 mol/L磷酸盐缓冲液、5%甘油)与100 μ L 0.5 mm的玻璃珠, 在研磨仪中2 400 r/min振荡90 s, 10 000 r/min离心5–10 min, 取5 μ L稀释后的上清液与250 μ L Bradford混匀后室温反应5 min, 测定 OD_{595} 值, 并按照标准曲线计算原样蛋白含量。

1.7 里氏木霉 $\Delta drs2$ 菌株酶活测定

1.7.1 内切葡聚糖酶与木聚糖酶相对酶活测定

1.5 mL EP管中, 反应体系总体积为200 μ L, 其中6 μ L 3 mol/L醋酸钠缓冲液(pH 5.0), 30 μ L 2% (W/V) Azo-CM-Cellulose或者Azo-CM-Xylan, 144 μ L ddH₂O, 20 μ L发酵上清液, 充分混匀。40 $^{\circ}$ C温育1 h后加入1 mL沉淀剂终止反应, 4 000 r/min离心20 min, 取200 μ L上清液至96孔板中, 利用酶标仪测定 OD_{590} 值表征其相对酶活。空白组使用灭活酶液作为对照, 每个样品做3个平行对照。

1.7.2 滤纸酶活测定

以Whatman No. 1滤纸为底物, 用滤纸的活性测定上清液中总纤维素酶的活性。将滤纸条置于25 mL具塞试管底部, 加入1.5 mL 0.5 mol/L的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 4.8), 50 $^{\circ}$ C预热10 min后加入500 μ L适当稀释后的酶液, 混合均匀后在50 $^{\circ}$ C反应1 h, 取200 μ L反应液与200 μ L DNS试剂混合均匀后在100 $^{\circ}$ C煮10 min, 冷却至室温后, 在540 nm处测量吸光度。滤纸酶活的单位定义为: 1 mL酶液在50 $^{\circ}$ C, pH 4.8条件下, 每小时水解滤纸生成1 mg还原糖所需要的酶量, 以U/mL表示。

1.8 RNA提取与qRT-PCR

使用RNA提取试剂(Keep, China)抽提

total-RNA, 通过反转录试剂盒(Transgen, China)将RNA反转录为cDNA。采用伯乐CFX 96 Touch荧光定量PCR仪(Bio-Rad, USA)检测相关基因相对表达量。以Actin为内参, 通过计算公式 $\text{Log}_2(C_{t-\text{test gene}}-C_{t-\text{actin}})$ 对各个基因进行相对表达量测定。

1.9 DRS2蛋白与GFP融合表达菌株DRS2-GFP的构建

以pMF272质粒为模板, 使用引物P5-F和P5-R扩增*gfp*基因, 使用引物P6-F和P6-R扩增里氏木霉*drs2*基因及其上游5'UTR同源臂, 使用引物P7-F和P7-R扩增里氏木霉*drs2*基因下游3'UTR同源臂以及pBluescript II SK(+)含Amp筛选标记的载体骨架片段, 利用Gibson连接获得敲除载体pDRS2-GFP。通过PCR将pDRS2-GFP载体的同源重组片段线性化, 将*pyr4*基因表达盒与pDRS2-GFP线性片段按照皮摩尔比为1:3的比例, 进行里氏木霉*Tu6 $\Delta ku70$* 原生质体转化以获得转化子DRS2-GFP。

1.10 DRS2亚细胞定位分析

将菌株DRS2-GFP接种到PDA平板上28 $^{\circ}$ C培养24 h, 待长出菌丝后使用生理盐水压片法进行制片: 在载玻片中间点一滴生理盐水(0.9% NaCl溶液), 用10 μ L移液吸头挑取微量菌丝沾于生理盐水中, 将盖玻片从一侧向另一侧缓缓盖上压紧。制片完毕后, 置于倒置激光共聚焦显微镜LSM 780 (ZEISS, 德国)进行观察(激发光波长为543 nm), 观察菌株的DRS2蛋白定位情况。

2 结果与分析

2.1 DRS2蛋白生物信息学分析

通过粗糙脉孢霉DRS-2蛋白序列(XP_957823.1)进行BLAST比对获得里氏木霉DRS2 (XP_006961068.1)同源蛋白的氨基酸序

列。进一步将里氏木霉翻转酶 DRS2 与其他真菌的同源蛋白进行比对分析,发现里氏木霉翻转酶 DRS2 在氨基酸水平上与粗糙脉孢霉 (*N. crassa*)、构巢曲霉 (*A. nidulans*)、黑曲霉 (*A. niger*)、酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 等真菌的翻转酶氨基酸序列分别具有 85%、79%、79%、77% 的相似性。将查找到的这些同源蛋白的氨基酸序列通过 maximum likelihood 法构建系统发育树 (图 1A)。结果表明,里氏木霉与粗糙脉孢霉翻转酶的亲缘关系最为相近。选择里氏木霉、粗糙脉孢霉、酿酒酵母的翻转酶进行结构域分析

(图 1B),结果发现翻转酶均含有 4 个功能保守的结构域: PhoLip_ATPase_N、E1-E2_ATPase、Cation_ATPase 和 PhoLip_ATPase_C,同时里氏木霉与粗糙脉孢霉 4 个功能保守的结构域位置相似,也进一步证明了里氏木霉 DRS2 蛋白与粗糙脉孢霉 DRS-2 蛋白有较近的亲缘关系。

2.2 里氏木霉 *drs2* 基因敲除菌株 $\Delta drs2$ 的构建

drs2 基因敲除菌株构建原理如图 2A 所示。对转化子进行 DNA 提取及 PCR 验证,结果如图 2B 所示, $\Delta drs2$ 转化子中使用引物

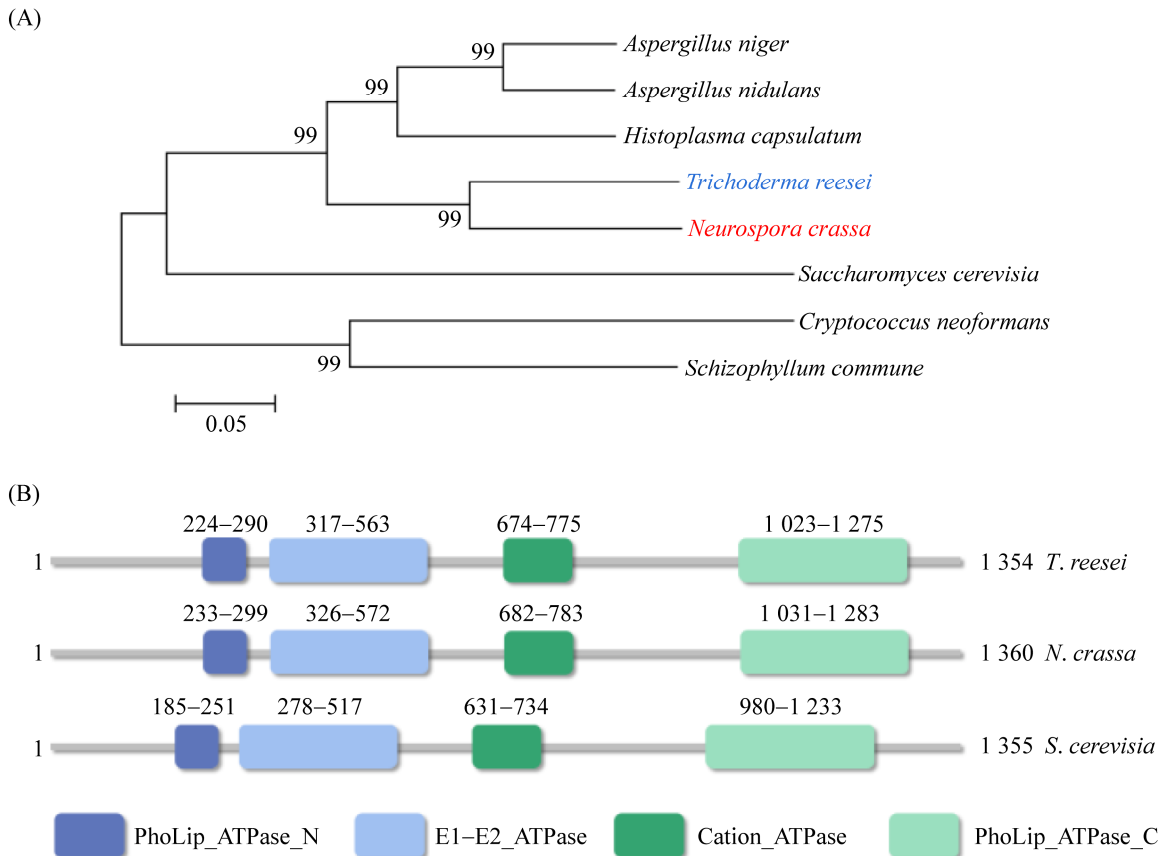


图 1 DRS2 同源蛋白的生物信息学分析

Figure 1 Bioinformatic analysis of DRS2 proteins from different fungi. A: phylogenetic tree of DRS2 homologous proteins in several fungal species. Numbers at the nodes indicate the confidence level from 1 000 replicate bootstrap samplings. The scale bar indicates the 0.05 evolutionary distance unit. B: homologue domain analysis of DRS2 proteins in different species.

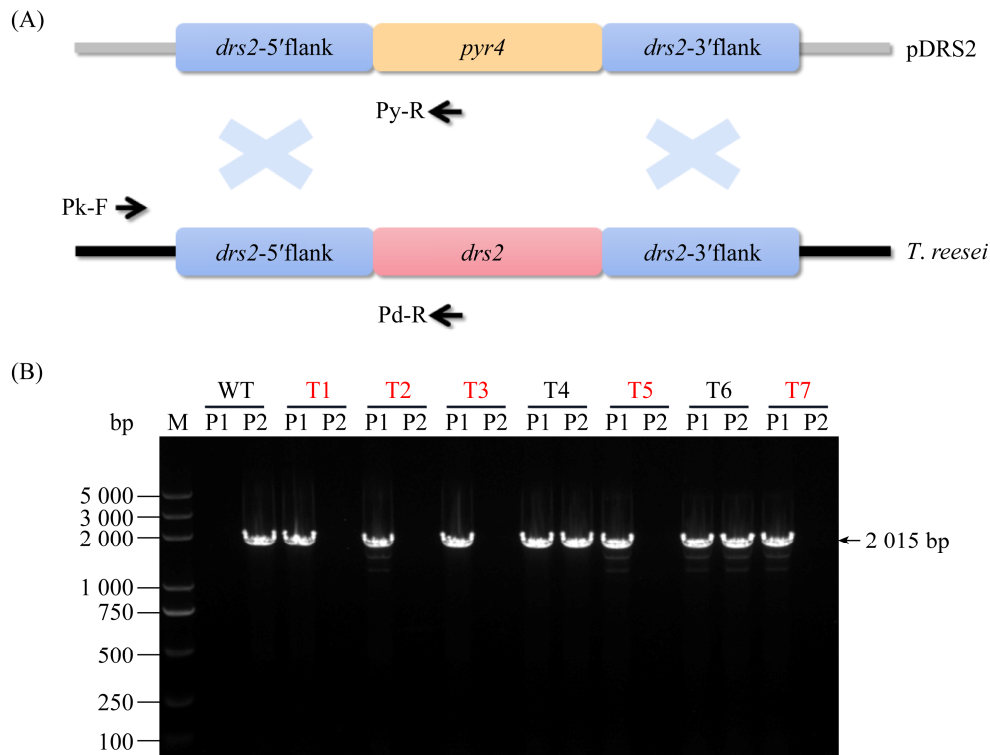


图 2 里氏木霉 *drs2* 基因敲除菌株构建

Figure 2 Construction of *drs2* deletion mutants in *T. reesei*. A: schematic diagram of homologous recombination occurred in $\Delta drs2$ strains. Arrows indicate the primers used for genotyping of transformants. B: genotypic analysis of $\Delta drs2$ transformants. M indicates DNA ladder marker, WT indicates wild type strain, T indicates transformant strains. Transformants highlighted in red indicate positive transformants.

P1(Pk-F/Py-R)扩增出 2 015 bp 左右的目的条带，而野生型菌株 *QM6a* 没有扩增出目的条带，这表明 *pyr4* 已经发生同源交换，成功插入里氏木霉 *Tu6Δku70* 基因组中。进一步使用 *drs2* 基因内部引物 P2(Pk-F/Pd-R)进行扩增，*drs2* 同核体没有目的条带，杂核体与野生型能扩增出 2 112 bp 的目的条带，说明里氏木霉 *drs2* 在基因组水平已经被定点敲除。通过 PCR 验证成功获得 5 株正确的 *drs2* 基因缺失同核体菌株，选取其中 3 株做进一步分析，将其命名为 $\Delta drs2-1$ 、 $\Delta drs2-2$ 和 $\Delta drs2-3$ ，后续使用这 3 株菌进行相应的实验。

2.3 *drs2* 基因对里氏木霉生长速率的影响

采用分别补加 2%葡萄糖和乳糖或 1%的 avicel 的 3 种固体 MM 培养基培养里氏木霉

$\Delta drs2$ 菌株与 *Cpyr4* 菌株，并通过每天测量菌丝辐射生长的直径，进行生长速率测定。结果如图 3A 所示，在葡萄糖、乳糖、avicel 3 种不同碳源上，里氏木霉 $\Delta drs2$ 菌株每 24 h 的生长速率分别为 1.30、1.05、1.11 cm；里氏木霉 *Cpyr4* 菌株在这 3 种培养基中每 24 h 的生长速率则分别为 2.50、1.95、2.24 cm，由此可见里氏木霉 $\Delta drs2$ 菌株在这 3 种碳源下的生长速率都明显慢于对照株 *Cpyr4*。为了进一步证明 $\Delta drs2$ 菌株生长速率比 *Cpyr4* 菌株缓慢，对 $\Delta drs2$ 菌株与 *Cpyr4* 菌株在液体环境中的生物量进行测定。如图 3B 所示，在乳糖条件下培养 120 h， $\Delta drs2$ 菌株的菌丝体干重明显低于 *Cpyr4* 菌株。在 avicel 条件下，为避免菌丝与 avicel 颗粒的

吸附导致菌丝干重难以准确测量,因此通过测量细胞内蛋白含量,间接地表征生物量^[10]。如图 3C 所示, $\Delta drs2$ 菌株胞内蛋白含量在 avicel 条件下明显低于 *Cpyr4* 菌株。用同样的方法对乳糖条件下的生物量也进行了间接表征,结果显示 $\Delta drs2$ 菌株胞内蛋白含量明显低于菌株 *Cpyr4*,与通过细胞干重的方式表征生物量的结果相吻合。这些数据表明,在里氏木霉中, *drs2* 基因缺失会导致菌体生长缓慢。在 3 种不同碳源下培养 4 d 后,里氏木霉 $\Delta drs2$ 菌株与

Cpyr4 菌株的生长表型如图 3D 所示, *Cpyr4* 菌株菌丝呈白色,然而 $\Delta drs2$ 菌株培养基中出现明显的黄色,说明 *drs2* 基因的敲除直接或间接影响了里氏木霉色素的某些代谢,导致黄色素生成。为了确定 *drs2* 基因对里氏木霉菌丝生长的影响,对里氏木霉 $\Delta drs2$ 菌株与 *Cpyr4* 菌株在 PDA 平板上菌丝生长状态进行显微观察,如图 3E 所示, $\Delta drs2$ 菌株与 *Cpyr4* 菌株相比,出现菌丝分支增多的现象。同时在 MM 培养基添加 2%乳糖液体环境下培养 13 h 左右观察孢

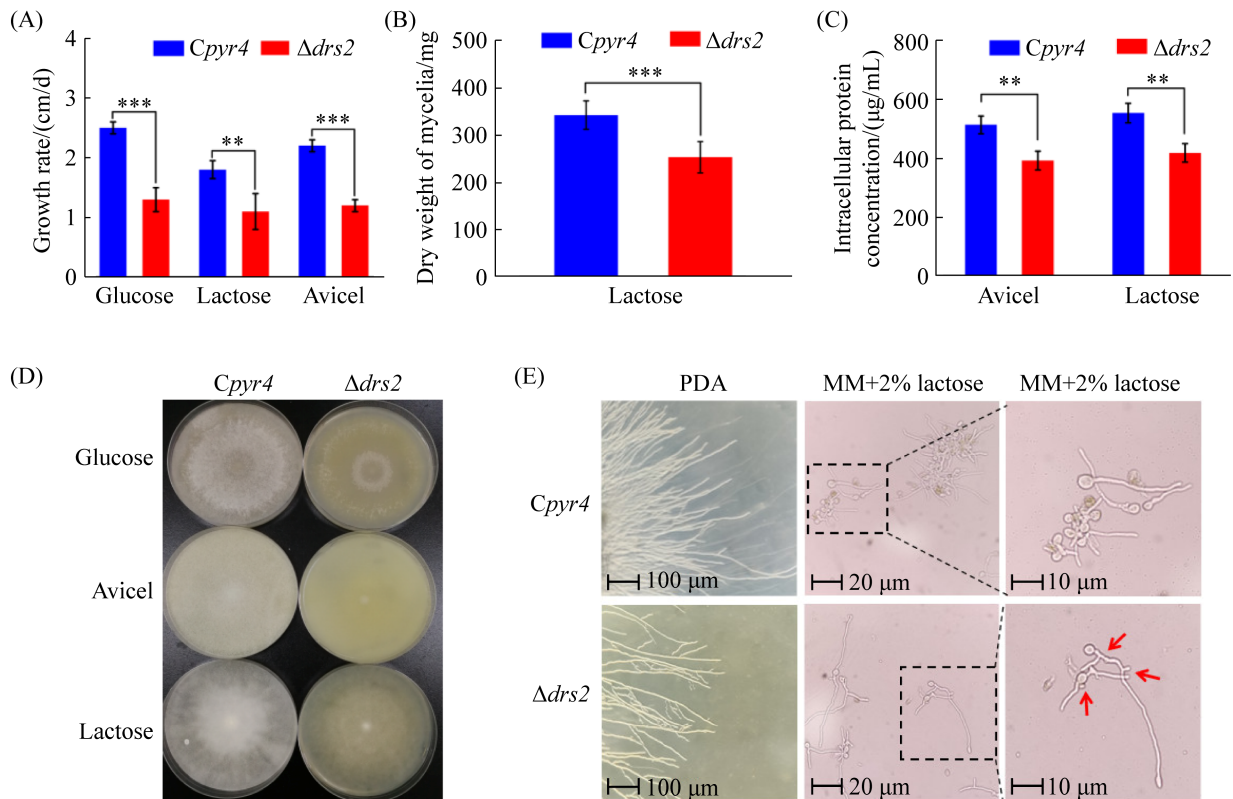


图 3 *drs2* 基因缺失对里氏木霉生长的影响

Figure 3 Growth phenotypic analysis of *drs2* deletion mutants in *T. reesei*. A: growth rates of the *Cpyr4* strains and $\Delta drs2$ strains under the indicated carbon source. B: the dry weight of mycelia in 120 h MM cultures with 2% lactose as the carbon source. C: the intracellular protein concentration of indicated strains after adding 1% avicel or 2% lactose into 48 h glucose-MM culture for 120 h. Asterisks indicate significant differences (**: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$). D: growth phenotype of *Cpyr4* strains and $\Delta drs2$ strains after 4 d inoculation under the indicated carbon source. E: microscopic observation of hyphae of *T. reesei* strains $\Delta drs2$ and *Cpyr4* after 24 h growth on PDA plates or MM submerged cultures with 2% lactose as the carbon source.

子萌发情况, *Cpyr4* 菌株孢子大多为单侧出芽, 然而 $\Delta drs2$ 菌株大多数为双侧或多侧出芽(如图 3E 红色箭头所示)。

2.4 *drs2* 基因对里氏木霉蛋白分泌水平的影响

为了研究里氏木霉中 *drs2* 基因的缺失是否会影响其蛋白分泌, 将里氏木霉 $\Delta drs2$ 菌株及 *Cpyr4* 菌株接种至分别补加 2%乳糖和 1% avicel 的 MM 液体培养基中, 在 28 °C、220 r/min 条件下进行摇瓶发酵, 120 h 后取发酵上清液进行蛋白浓度测定及 SDS-PAGE 验证。如图 4A 所示, 在 avicel 条件下里氏木霉 $\Delta drs2$ 菌株的胞外蛋白浓度为 312 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 约为 *Cpyr4* 菌株胞外蛋白浓度的 3 倍。然而在乳糖条件下, 里氏木霉 $\Delta drs2$ 菌株与 *Cpyr4* 菌株的蛋白分泌量没有显著性差异。进一步对两种条件下的发酵上清液进行 SDS-PAGE 电泳分析, 在 avicel 条件下, $\Delta drs2$ 菌株的蛋白分泌水平明显高于 *Cpyr4* 菌株(图 4B)。乳糖条件下, 野生型与突变株发酵上清液的蛋白分泌量相当。但由于 $\Delta drs2$ 菌株的生物量明显低于 *Cpyr4* 菌株(图 3C), 因此在乳糖条件下, *drs2* 基因敲除后, 单位菌体的

蛋白分泌量也是显著增加的。这些结果表明, 在里氏木霉中 *drs2* 基因的敲除可以显著提高菌株的蛋白分泌量, 与粗糙脉孢霉的结果较为一致。

2.5 *drs2* 基因对里氏木霉纤维素酶活力的影响

里氏木霉是纤维素酶和半纤维素酶的主要生产菌株, 其胞外蛋白的主要成分为木质纤维素降解酶。前述实验表明, *drs2* 基因的缺失可以显著提高菌体的蛋白分泌水平, 为了证明外分泌蛋白是否与纤维素酶活性相关, 对发酵上清液的纤维素酶活力、半纤维素酶活力进行了测定, 结果如图 5 所示。图 5A 与图 5C 显示, 在 avicel 条件下里氏木霉 $\Delta drs2$ 菌株的纤维素酶活力(CMC 酶活与滤纸酶活)约为 *Cpyr4* 菌株的 2 倍。然而, 在乳糖条件下培养时, 里氏木霉 $\Delta drs2$ 菌株与 *Cpyr4* 菌株的纤维素酶活力没有显著性差异。木聚糖酶活力的实验结果与纤维素酶活力结果相似(图 5B), 以上结果与蛋白分泌量的结果是一致的。由此说明, 里氏木霉中 *drs2* 基因的敲除可以显著提高其纤维素诱导条件下的纤维素酶和半纤维素酶的产量。

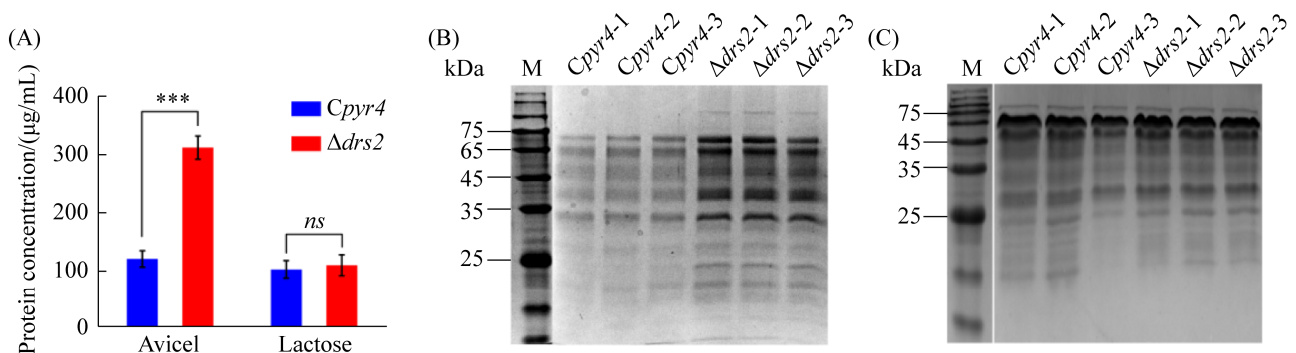


图 4 *drs2* 基因缺失对里氏木霉蛋白分泌的影响

Figure 4 The effect of *drs2* gene deletion on protein secretion in *T. reesei*. A: total secreted protein levels in the supernatant of 120 h MM with 1% avicel culture. B: SDS-PAGE analysis of the supernatant in 120 h MM with 1% avicel culture. C: SDS-PAGE analysis of the supernatant in 120 h MM with 2% lactose. Asterisks indicate significant differences (***: $P < 0.001$). ns: not significant. The loading amount of protein was 10 μL .

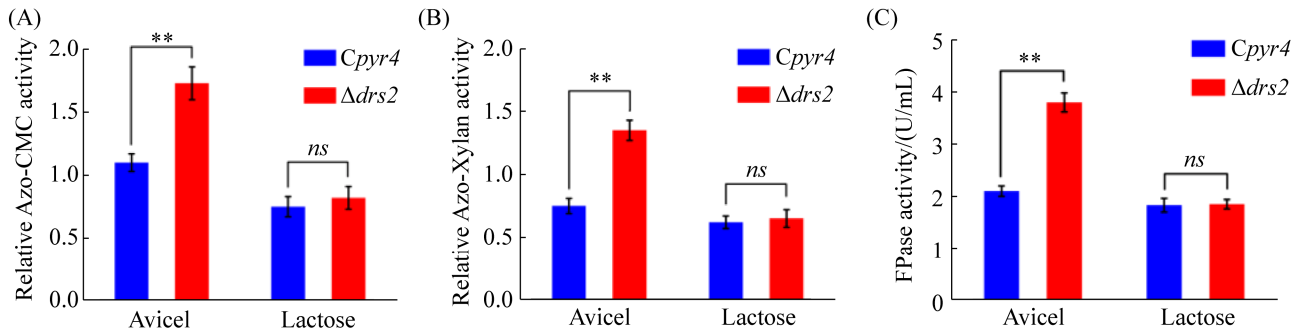


图 5 *drs2* 基因缺失对里氏木霉纤维素酶活力的影响

Figure 5 Enzyme activity of *drs2* deletion mutants in *T. reesei*. A: relative Azo-CMC activity. B: relative Azo-Xylan activity. C: FPase activity. The samples were taken from the supernatant of 120 h cultures in MM with 1% avicel or 2% lactose as carbon source. Asterisks indicate significant differences (**: $P < 0.01$). ns: not significant.

2.6 *drs2* 基因对里氏木霉纤维素酶基因转录水平的影响

里氏木霉木质纤维素降解酶基因的调控主要发生在转录水平，为研究 *drs2* 基因对里氏木霉纤维素酶基因的转录水平是否产生影响，将里氏木霉 Δ *drs2* 菌株与里氏木霉 *Cpyr4* 菌株接种至添加 1% avicel MM 液体培养基中，在 28 °C、220 r/min 条件下进行摇瓶发酵。在 24 h 进行 RNA 提取，以 Actin 为内参，使用引物 Tcbh1-RT-F 与 Tcbh1-RT-R 对纤维素酶基因 *cbh1*、引物 Tcbh2-RT-F 与 Tcbh2-RT-R 对纤维素酶基因 *cbh2*、引物 Tegl1-RT-F 与 Tegl1-RT-R 对内切葡聚糖酶基因 *egl1*、引物 Tbg11-RT-F 与 Tbg11-RT-R 对 β -葡萄糖苷酶基因 *bg11* 进行荧光定量 PCR 检测。结果如图 6 所示，里氏木霉 Δ *drs2* 菌株的外切纤维素酶基因 *cbh-1* 与 *cbh-2* 的相对转录水平略有提升，但出现显著性差异，同时 *Cpyr4* 与 Δ *drs2* 菌株内切纤维素酶基因 *egl1* 与 *bg11* 的转录水平与外切纤维素酶基因结果相似，均没有出现显著性差异。因此 *drs2* 基因对于里氏木霉纤维素酶基因的转录水平没有显著性影响，说明在里氏木霉中，*drs2* 基因缺失引起蛋白分泌量增加发生在转录后，有可能 DRS2 蛋白的存在影响菌体的蛋白翻译及分泌过程。

2.7 DRS2 蛋白与 GFP 融合表达菌株 DRS2-GFP 的构建

图 7A 为菌株 DRS2-GFP 构建示意图。对 DRS2-GFP 转化子进行 PCR 验证结果如图 7B 所示，利用 GFP 特异性上游引物 Pm-F 与 *drs2*

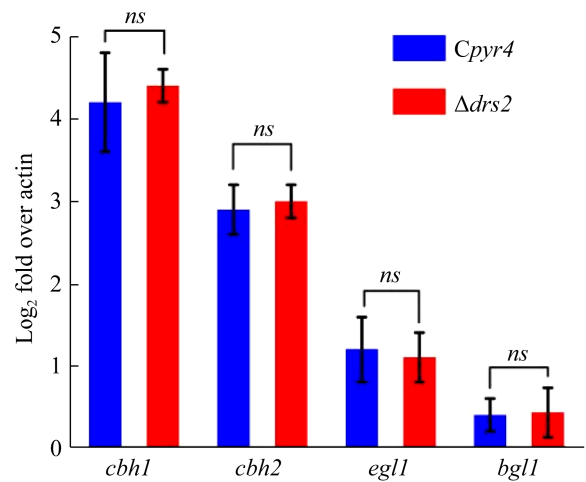


图 6 *drs2* 基因缺失对里氏木霉纤维素酶基因转录水平的影响

Figure 6 Transcriptional levels of cellulase genes in *drs2* deletion mutants. Relative quantification of the amount of *cbh1*, *cbh2*, *egl1* and *bg11* mRNA in *drs2* deletion mutants by qRT-PCR. The samples were taken from 24 h MM with 1% avicel following a shift from 48 h glucose-MM culture. Asterisks indicate significant differences. ns: not significant.

3'UTR 基因组下游 100 bp 左右的引物 Pk-R 进行验证, DRS2-GFP 转化子使用引物 Pm-F 与 Pk-R 扩增出 2 373 bp 左右的目的条带, 而野生型菌株 *QM6a* 没有扩增出目的条带, 这表明 DRS2-GFP 菌株构建成功, 通过 PCR 验证成功获得 1 株正确的 DRS2 蛋白与 GFP 融合表达菌株, 将其命名为 DRS2-GFP 进行下一步分析。

2.8 DRS2 亚细胞定位分析

通过在里氏木霉 DRS2 蛋白 C 端融合表达 GFP 绿色荧光蛋白, 观察 DRS2 的亚细胞定位。将 DRS2-GFP 接种到 PDA 培养基中, 28 °C 培养 12 h 后对其菌丝进行激光共聚焦显微镜观察。结果显示, 在菌丝生长顶端位置出现明显的荧光信号(图 8)。有研究表明, DRS2 在构巢曲霉的同

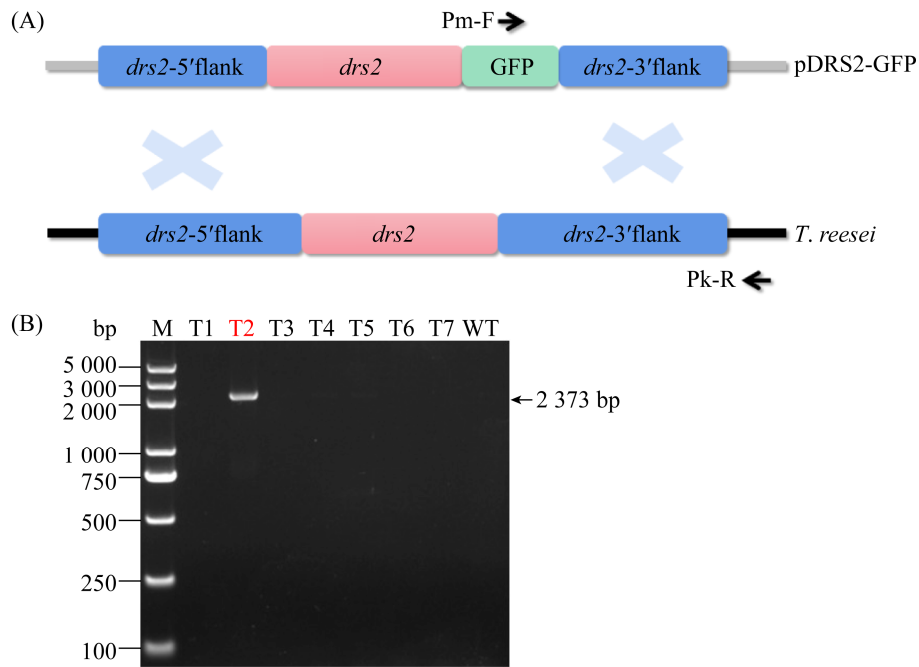


图 7 里氏木霉 DRS2-GFP 菌株构建

Figure 7 Construction of DRS2-GFP mutants in *T. reesei*. A: schematic diagram of homologous recombination occurred in DRS2-GFP strains. Arrows indicate the primers used for genotyping of transformants. B: genotypic analysis of DRS2-GFP transformants. M indicates DNA ladder marker, WT indicates wild type strain, T indicates transformant strains. Transformants highlighted in red indicate positive transformants.

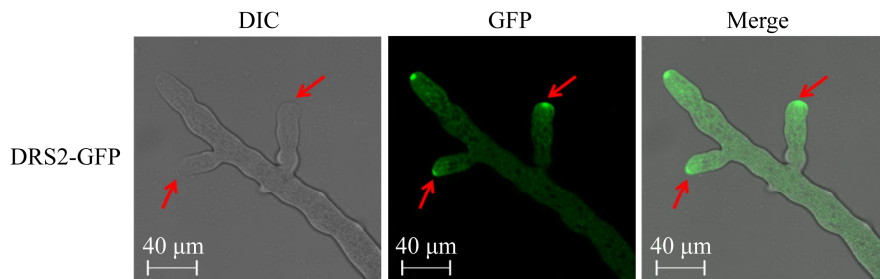


图 8 里氏木霉 DRS2 亚细胞定位分析

Figure 8 Analysis of the localization of DRS2 in *T. reesei*.

源蛋白 DnfB 位于菌丝顶体(spitzenkörper)^[11]。顶体是许多丝状真菌菌丝顶端的细胞结构,由一群有组织的分泌囊泡组成。因此,我们推测里氏木霉 DRS2 也位于顶体,直接参与了蛋白的分泌运输。

3 讨论

丝状真菌里氏木霉作为生产纤维素酶、半纤维素酶的重要工业菌株,其生物安全性好,且具有与高等哺乳动物非常相似的糖基化修饰系统以及其他蛋白修饰分泌机制,近年来也被广泛用作表达外源蛋白的宿主^[12]。目前关于里氏木霉纤维素酶以及重组蛋白的表达调控研究主要集中在转录水平,例如通过调控主要的纤维素酶转录调控因子 *xyl1*^[13]、*cre1*^[14]等实现了不同碳源上纤维素酶的表达调控。而转录后的蛋白翻译、修饰、运输和分泌等过程的调控研究则相对较少。作为模式生物的粗糙脉孢霉,因其成熟的分子遗传研究手段,在生命科学的各个领域都取得了多个重大突破^[15]。粗糙脉孢霉的木质纤维素降解研究已有 30 多年的历史,尤其是近年来,已发展为丝状真菌降解植物细胞壁的模式系统^[16],许多新的调控因子被揭示并作为参考用于其他腐生丝状真菌的遗传改造^[17-18]。本文研究的 *drs2* 基因也是建立在粗糙脉孢霉的最新发现上^[6]。

翻转酶又称磷脂转位蛋白(phospholipid translocator),是细胞膜上将磷脂从膜的一侧翻转到另一侧的酶。研究最清楚的翻转酶是酿酒酵母中 P4 ATP 酶的成员 Dnf1p, Dnf2p, Dnf3p, Drs2p 和 Neolp,它们分别负责不同类型的磷脂分子翻转^[19]。其中, Drs2p 为本文研究的 *drs2* 基因在酿酒酵母中的同源基因编码蛋白,其负责特异性地翻转磷脂酰丝氨酸。研究发现, Drs2p 蛋白与膜蛋白 Cdc50p 以异二聚体形式存在,在

维持反式高尔基体网络(trans-Golgi network, TGN)和质膜上的磷脂酰丝氨酸极性中发挥重要作用^[20-23]。另有研究发现,在酿酒酵母中,反式高尔基体网络和早期内体(early endosome, EE)之间的蛋白质运输需要 Drs2p。Drs2p 与 ArfGTPase 激活蛋白 Gcs1 相互作用通过改变高尔基体膜的曲率来促进晚期分泌途径的进行^[24]。此外, Drs2p 与 AP-1 网格蛋白适配器复合体(AP-1 clathrin adaptor)存在直接相互作用, AP-1 复合体主要介导蛋白从反式高尔基体网络到早期内体之间的囊泡运输^[25]。酿酒酵母中的这些研究结果表明 Drs2p 可能参与了分泌型蛋白的囊泡运输。

本研究首先构建了里氏木霉 *drs2* 基因的敲除菌株 Δ *drs2*。因出发菌株为尿苷缺陷型菌株,为了避免尿苷对菌株后期分析的影响,同时构建了一株尿苷合成回补菌株 *Cpyr4* 作为对照株,用于分析 *drs2* 基因的缺失对菌株生长、蛋白分泌以及产酶的影响。研究结果与粗糙脉孢霉的研究结果一致,里氏木霉 *drs2* 基因的缺失显著提高了其木质纤维素酶的产量。然而,进一步对关键纤维素酶基因的转录水平进行检测发现,里氏木霉主要的纤维素酶基因 *cbh1*、*cbh2*、*egl1* 和 *bgl1* 在 Δ *drs2* 菌株和 *Cpyr4* 菌株中的转录水平相当,说明翻转酶 DRS2 对纤维素酶的调控作用并不是发生在转录水平,而是发生在转录后的蛋白翻译、折叠以及运输与分泌阶段。进一步对 DRS2 蛋白进行定位分析发现,里氏木霉 DRS2 蛋白定位在菌丝生长顶端,而 *drs2* 基因敲除株与其对照菌株相比,菌丝分叉更多,推测 DRS2 可能参与调控菌丝的极性生长。

关于翻转酶在丝状真菌中的研究报道非常有限。目前,除了本研究和粗糙脉孢霉中的研究结果显示翻转酶 DRS2 的缺失可以导致胞外

蛋白分泌量增加外,在构巢曲霉中, Schultzhause 等曾对 2 个翻转酶 DnfA (Dnf1p 的同源蛋白)和 DnfB (Drs2p 的同源蛋白)的细胞定位研究发现,与酿酒酵母不同,这两个翻转酶均位于丝状真菌特有结构顶体(spitzenkörper)的胞吞部位^[11,26-27]。酿酒酵母不具有顶体结构,丝状真菌的顶体结构位于菌丝生长顶端,由许多分泌囊泡组成,分泌型蛋白通常是从菌丝顶端分泌出去的,这可能是 DRS2 对蛋白分泌的影响在丝状真菌与酿酒酵母中截然相反的原因。总之,这些结果表明翻转酶极有可能在真菌分泌型蛋白的运输过程发挥重要调控作用,但其具体的调控机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] Cherry JR, Fidantsef AL. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14(4): 438–443.
- [2] Turgeon BG, Yoder OC. Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 2000, 31(1): 1–5.
- [3] Visser H, Joosten V, Punt PJ, Gusakov AV, Olson PT, Joosten R, Bartels J, Visser J, Sinitsyn AP, Emalfarb MA, Verdoes JC, Wery J. RESEARCH: development of a mature fungal technology and production platform for industrial enzymes based on a *Myceliophthora thermophila* isolate, previously known as *Chrysosporium lucknowense* C1. *Industrial Biotechnology*, 2011, 7(3): 214–223.
- [4] Quintanilla D, Hagemann T, Hansen K, Gernaey KV. Fungal morphology in industrial enzyme production—modelling and monitoring. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2015, 149: 29–54.
- [5] Pedersen NR, Tovborg M, Farjam AS, Pia EAD. Multicomponent carbohydrase system from *Trichoderma reesei*: a toolbox to address complexity of cell walls of plant substrates in animal feed. *PLoS One*, 2021, 16(6): e0251556.
- [6] Kalia S, Bhattacharya A, Prajapati SK, Malik A. Utilization of starch effluent from a textile industry as a fungal growth supplement for enhanced α -amylase production for industrial application. *Chemosphere*, 2021, 279: 130554.
- [7] Liu J. Dissecting cellulase hypersecretion in *Neurospora crassa*. University of California, Berkeley, 2017.
- [8] Sakane H, Yamamoto T, Tanaka K. The functional relationship between the Cdc50p-Drs2p putative aminophospholipid translocase and the Arf GAP Gcs1p in vesicle formation in the retrieval pathway from yeast early endosomes to the TGN. *Cell Structure and Function*, 2006, 31(2): 87–108.
- [9] Chen CY, Ingram MF, Rosal PH, Graham TR. Role for Drs2p, a P-type ATPase and potential aminophospholipid translocase, in yeast late Golgi function. *The Journal of Cell Biology*, 1999, 147(6): 1223–1236.
- [10] Qin LN, Cai FR, Dong XR, Huang ZB, Tao Y, Huang JZ, Dong ZY. Improved production of heterologous lipase in *Trichoderma reesei* by RNAi mediated gene silencing of an endogenic highly expressed gene. *Bioresource Technology*, 2012, 109: 116–122.
- [11] Schultzhause Z, Zheng WH, Wang ZH, Mouriño-Pérez R, Shaw B. Phospholipid flippases DnfA and DnfB exhibit differential dynamics within the *A. nidulans* spitzenkörper. *Fungal Genetics and Biology*, 2017, 99: 26–28.
- [12] Jiang XZ, Du JW, He RN, Zhang ZY, Qi F, Huang JZ, Qin LN. Improved production of majority cellulases in *Trichoderma reesei* by integration of *cbh1* gene from *Chaetomium thermophilum*. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1633.
- [13] Druzhinina IS, Kubicek CP. Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(6): 1485–1499.
- [14] Jiang YP, Duarte AV, Van Den Brink J, Wiebenga A, Zou G, Wang CS, De Vries RP, Zhou ZH, Benoit I. Enhancing saccharification of wheat straw by mixing enzymes from genetically-modified *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(1): 65–70.
- [15] Mello-De-Sousa TM, Gorsche R, Rassinger A, Poças-Fonseca MJ, Mach RL, Mach-Aigner AR. A truncated form of the carbon catabolite repressor 1 increases cellulase production in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 129.
- [16] Roche CM, Loros JJ, McCluskey K, Glass NL. *Neurospora crassa*: looking back and looking forward at a model microbe. *American Journal of Botany*, 2014, 101(12): 2022–2035.

- [17] Znameroski EA, Glass NL. Using a model filamentous fungus to unravel mechanisms of lignocellulose deconstruction. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 6.
- [18] Kunitake E, Kobayashi T. Conservation and diversity of the regulators of cellulolytic enzyme genes in *Ascomycete* fungi. *Current Genetics*, 2017, 63(6): 951–958.
- [19] Reilly MC, Qin LN, Craig JP, Starr TL, Glass NL. Deletion of homologs of the SREBP pathway results in hyper-production of cellulases in *Neurospora crassa* and *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 121.
- [20] Hankins HM, Baldrige RD, Xu P, Graham TR. Role of flippases, scramblases and transfer proteins in phosphatidylserine subcellular distribution. *Traffic: Copenhagen, Denmark*, 2015, 16(1): 35–47.
- [21] Azouaoui H, Montigny C, Dieudonné T, Champeil P, Jacquot A, Vázquez-Ibar JL, Le Maréchal P, Ulstrup J, Ash MR, Lyons JA, Nissen P, Lenoir G. High phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P)-dependent ATPase activity for the Drs2p-Cdc50p flippase after removal of its N- and C-terminal extensions. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(19): 7954–7970.
- [22] Azouaoui H, Montigny C, Ash MR, Fijalkowski F, Jacquot A, Grønberg C, López-Marqués RL, Palmgren MG, Garrigos M, le Maire M, Decottignies P, Gourdon P, Nissen P, Champeil P, Lenoir G. A high-yield co-expression system for the purification of an intact Drs2p-Cdc50p lipid flippase complex, critically dependent on and stabilized by phosphatidylinositol-4-phosphate. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112176.
- [23] Saito K, Fujimura-Kamada K, Furuta N, Kato U, Umeda M, Tanaka K. Cdc50p, a protein required for polarized growth, associates with the Drs2p P-type ATPase implicated in phospholipid translocation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 2004, 15(7): 3418–3432.
- [24] Lenoir G, Williamson P, Puts CF, Holthuis JCM. Cdc50p plays a vital role in the ATPase reaction cycle of the putative aminophospholipid transporter Drs2p. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(27): 17956–17967.
- [25] Xu P, Baldrige RD, Chi RJ, Burd CG, Graham TR. Phosphatidylserine flipping enhances membrane curvature and negative charge required for vesicular transport. *The Journal of Cell Biology*, 2013, 202(6): 875–886.
- [26] Schultzhäus Z, Yan HJ, Shaw BD. *Aspergillus nidulans* flippase DnfA is cargo of the endocytic collar and plays complementary roles in growth and phosphatidylserine asymmetry with another flippase, DnfB. *Molecular Microbiology*, 2015, 97(1): 18–32.
- [27] Schultzhäus Z, Shaw BD. The flippase DnfB is cargo of fimbrin-associated endocytosis in *Aspergillus nidulans*, and likely recycles through the late Golgi. *Communicative & Integrative Biology*, 2016, 9(2): e1141843.

(本文责编 张晓丽)