



里氏木霉 Set2 通过调控转录因子 Ypr1 的表达进而控制 sorbicillinoids 的生物合成

王磊¹, 刘佳龙¹, 李晓桐¹, 陆昕¹, 冯焱², 解军^{1*}

1 山西医科大学基础医学院, 反向病原学协同创新中心, 生物化学与分子生物学教研室, 山西 太原 030001

2 山西农业大学生命科学学院, 山西 晋中 030801

王磊, 刘佳龙, 李晓桐, 陆昕, 冯焱, 解军. 里氏木霉 Set2 通过调控转录因子 Ypr1 的表达进而控制 sorbicillinoids 的生物合成. 微生物学报, 2022, 62(8): 3213–3223.

Wang Lei, Liu Jialong, Li Xiaotong, Lu Xin, Feng Yan, Xie Jun. *Trichoderma reesei* Set2 modulates sorbicillinoid biosynthesis via regulating the expression of transcription factor Ypr1. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 3213–3223.

摘要: 【目的】Sorbicillinoids 是里氏木霉合成的一类重要的天然活性物质, 具有抗肿瘤、抗氧化及抗病毒等多种生物活性。本研究主要是为了阐明 TrSet2 在里氏木霉 sorbicillinoids 合成调控过程中的生物学功能及其作用机制。【方法】基于生物信息分析技术鉴定里氏木霉 TrSet2 编码基因。采用基因敲除和过表达手段, 分别构建 *Trset2* 基因敲除和过表达菌株并评估其 sorbicillinoids 合成能力。同时在 *Trset2* 基因敲除菌株中, 过表达转录激活因子 Ypr1, 明确 TrSet2 和 Ypr1 之间的调控关系。【结果】*Trset2* 基因敲除菌株完全丧失了合成 sorbicillinoids 的能力。相反, 过表达 *Trset2* 导致 sorbicillinoids 合成的水平显著增加。进一步研究发现, 在 *Trset2* 基因敲除菌株中过表达转录激活因子 Ypr1 逆转了其不能合成 sorbicillinoids 的表型。【结论】本研究明确了 TrSet2 在里氏木霉合成 sorbicillinoids 过程中的正向调控作用, 其作用机制是通过控制转录因子 Ypr1 的表达水平实现的。这为基于调控机理控制里氏木霉发酵过程中 sorbicillinoids 的产生或构建高水平合成 sorbicillinoids 的细胞工厂提供了理论依据和指导。

关键词: sorbicillinoids; 次级代谢; TrSet2; Ypr1; 里氏木霉

基金项目: 山西医科大学博士科研启动基金(XD1906); 山西省博士科研启动基金(SD1906); 山西省面上青年基金(201901D211315)

Supported by the Science Research Start-Up Fund for Doctor of Shanxi Medical University (XD1906), by the Science Research Start-Up Fund for Doctor of Shanxi Province (SD1906) and by the Shanxi Province Science Foundation for Youths (201901D211315)

*Corresponding author. E-mail: junxie@sxmu.edu.cn

Received: 20 December 2021; Revised: 1 February 2022; Published online: 16 February 2022

Trichoderma reesei Set2 modulates sorbicillinoid biosynthesis via regulating the expression of transcription factor Ypr1

WANG Lei¹, LIU Jialong¹, LI Xiaotong¹, LU Xin¹, FENG Yan², XIE Jun^{1*}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Collaborative Innovation Center of Reverse Microbial Etiology, School of Basic Medical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China

² College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, Shanxi, China

Abstract: [Objective] Sorbicillinoids are important natural active compounds synthesized by *Trichoderma reesei* and exhibit various biological activities, such as antineoplastic, antioxidative, and antiviral properties. In this study, we aimed to clarify the biological functions and regulatory mechanisms of TrSet2 during sorbicillinoid biosynthesis in *T. reesei*. [Methods] We identified the gene encoding TrSet2 in *T. reesei* using bioinformatic analysis, and investigated its functions in sorbicillinoid biosynthesis by knocking out and overexpressing *Trset2* gene. In addition, the transcription activator Ypr1 was overexpressed in *Trset2* knockout strain to elucidate the regulatory mechanism between TrSet2 and Ypr1. [Results] Knockout of *Trset2* led to the strain's inability to synthesize sorbicillinoids. Conversely, overexpression of *Trset2* resulted in a significant increase in sorbicillinoid secretion. Further studies showed that overexpression of Ypr1 in *Trset2* knockout strain restored sorbicillinoid production. [Conclusion] TrSet2 positively regulated the sorbicillinoid biosynthesis via controlling the expression of Ypr1. Our results facilitated the control of sorbicillinoid secretion during the fermentation of *T. reesei* and the development of cell factories for high-level synthesis of sorbicillinoids based on the regulatory mechanism.

Keywords: sorbicillinoids; secondary metabolism; TrSet2; Ypr1; *Trichoderma reesei*

真菌是天然活性产物的重要来源，其合成的活性成分可直接或者作为前体物质经加工修饰后作为药物成分用于人类或者动物疾病的治疗^[1]。通常情况下，这些天然活性成分是真菌次级代谢的产物，它们对微生物本身的生存不是必需的，主要用于细胞间信号传递、交流、竞争和防御等方面。真菌次级代谢基因通常是成簇存在，它们的表达受到严格的调控。Sorbicillinoids 是由真菌合成的一种天然次级代谢产物，目前已经发现的 sorbicillinoids 大约有 90 多种^[2]。研究表明，sorbicillinoids 具备多种生物活性，具备广阔的应用前景。例如，部分 sorbicillinoids 组分表现出了明显的 α -葡萄糖苷酶抑制活性，且其抑制效果明显高于目前市售

药物阿卡波糖^[3]，这说明 sorbicillinoids 具备良好的治疗糖尿病潜力。

真菌里氏木霉(*Trichoderma reesei*)是工业上重要的纤维素酶生产菌株，其分泌的水解酶在木质纤维素类生物质资源的利用方面发挥着非常重要的作用^[4]。然而，在里氏木霉发酵过程中，伴随着纤维素酶的分泌其还会合成大量的 sorbicillinoids^[5-6]。在下游的纤维素酶纯化过程中，去除 sorbicillinoids 使得工艺更加复杂，不仅增加了生产成本，同时活性成分 sorbicillinoids 也没有得到很好的利用。因此，在里氏木霉发酵过程中控制 sorbicillinoids 的合成显得尤为重要。此外，尽管 sorbicillinoids 是具备多种活性的次级代谢物，但关于它的应用研究仍然较为

滞后。因此, 开发 sorbicillinoids 高产菌株是推动其走向应用的关键环节。然而, 无论是控制里氏木霉纤维素酶生产过程中 sorbicillinoids 的合成还是构建高水平合成 sorbicillinoids 的细胞工厂, 均需要对 sorbicillinoids 合成的调控机制有较为清晰的理解和认识。

真菌的次级代谢基因簇的激活或抑制通常会受到染色质水平的调控^[7]。大量的研究表明, 干扰染色质调控基因的表达或功能可显著改变真菌次级代谢模式^[8]。负责里氏木霉 sorbicillinoids 合成的基因簇(*sor* 基因簇)主要包括 8 个基因, 分别是 *sor1-6* 和 2 个转录调控因子编码基因 *ypr1* 和 *ypr2*。有研究表明, Ypr1 是 *sor* 基因簇的激活因子, 它的敲除导致里氏木霉彻底无法分泌 sorbicillinoids, 而其过表达可显著提高 sorbicillinoids 的合成水平。而转录因子 Ypr2 的主要功能可能是提供一个负反馈抑制机制去控制 Ypr1 的表达, 保证细胞适时适量地合成 sorbicillinoids^[9-10]。然而, 到目前为止, 几乎还没有关于 *sor* 基因簇染色质水平调控的研究。这极大地限制了人们对里氏木霉 sorbicillinoids 合成的认识及其进一步的应用。

在本研究中, 我们在里氏木霉中鉴定了一个保守的组蛋白 H3K36 甲基转移酶 TrSet2, 并对其调控 sorbicillinoids 合成的生物学功能进行了表征。敲除 *Trset2* 基因后, 里氏木霉就无法合成 sorbicillinoids, 而过表达 *Trset2* 后, 里氏木霉合成 sorbicillinoids 的能力显著增加, 这说明 TrSet2 可激活里氏木霉 sorbicillinoids 的生物合成。考虑到 $\Delta Trset2$ 菌株中 *ypr1* 的转录显著下调, 我们在该菌株中又过表达了 *ypr1* 基因。结果显示, 过表达 *ypr1* 可明显地逆转 $\Delta Trset2$ 菌株不能合成 sorbicillinoids 的表型。这表明 TrSet2 可通过调控 Ypr1 的表达进而控制里氏木霉 sorbicillinoids 的合成。我们的研究为解析里

氏木霉 sorbicillinoids 生物合成机制提供了重要线索, 能够促进阐明其复杂的调控网络, 对于调控机理控制 sorbicillinoids 的合成或开发高水平合成 sorbicillinoids 的细胞平台具有重要的指导意义。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养条件

在本研究中, 大肠杆菌 DH5 α 用于质粒构建和扩增。大肠杆菌培养使用 LB 培养基, 培养温度为 37 °C, 摇床转速为 200 r/min。里氏木霉 QM9414 (ATCC_26921) 在整个研究中作为对照菌株, 其 *pyr4* 基因敲除菌株 QM9414- $\Delta pyr4$ ^[11] 作为出发菌株用于基因重组菌株构建。里氏木霉发酵培养过程如下: 首先将里氏木霉的孢子接种于添加 1 g/L 蛋白胨和 1% (V/V) 甘油的 MA 培养基(17.907 g/L Na₂HPO₄·12H₂O, 2 g/L K₂HPO₄, 1.4 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.3 g/L Urea, 0.15 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.15 g/L CaCl₂, 0.005 g/L FeSO₄·7H₂O, 0.001 6 g/L MnSO₄·H₂O, 0.001 4 g/L ZnSO₄·7H₂O, 0.002 g/L CoCl₂·2H₂O, 0.5 mL/L Tween-80, pH 5.0) 中预培养 48 h。然后经漏斗过滤收集菌丝, 双蒸水清洗 2 遍后, 将等量湿重的菌丝转移至添加 1% (W/V) 葡萄糖或纤维素的 MA 培养基中进行发酵培养。里氏木霉培养温度为 30 °C, 摇床转速为 200 r/min。

1.2 质粒和重组菌株构建

提取里氏木霉 QM9414 菌株的基因组, 并以其为模板使用 *set2-up-F/set2-up-R* 和 *set2-down-F/set2-down-R* 引物对分别扩增 *Trset2* 基因的上游(约 2.4 kb)和下游(约 1.7 kb)同源臂片段, 然后通过 BP 克隆连入 pDONOR*pyr4*^[12] 载体获得 pDONOR- $\Delta Trset2$ 质粒, 质粒经 I-Sce I 限制性内切酶线性化后转化 QM9414- $\Delta pyr4$ 原生质体, 在不含有尿苷的培养条件下筛选获得 $\Delta Trset2$

重组菌株。使用 *OEset2-F/OEset2-R* 引物对扩增 *Trset2* 基因的编码区, 采用无缝克隆方法连入 *pKD-hph*^[11] 载体的 *EcoR V/Not I* 位点, 获得 *pOE-Trset2* 质粒, 然后将该质粒转入 $\Delta Trset2$ 菌株, 在含有 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 培养条件下筛选得到 *OETrset2* 菌株。使用 *OEypr1-F/OEypr1-R* 引物对扩增 *ypr1* 基因编码区, 采用

无缝克隆方法连入 *pKD-hph* 获得 *pOE-ypr1* 质粒, 然后将该质粒转入 $\Delta Trset2$ 菌株, 采用与 *OETrset2* 菌株相同的筛选方法得到 $\Delta Trset2\&OEypr1$ 菌株。质粒与基因重组菌株构建引物见表 1。

1.3 引物

引物见表 1。

表 1 本研究所使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
<i>set2-up-F</i>	TAGGGATAACAGGGTAATTCTCGCTCATCTCGCCTTGT
<i>set2-up-R</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAGTTCTCGCCATCTCCTGCT
<i>set2-down-F</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATGCATGCGTACCAGATCC
<i>set2-down-R</i>	ATTACCTGTTATCCCTACATTAAGTGAATATGTGCAGTC
<i>Vset2-up-F</i>	GGTATACGGGCAGTCTGT
<i>Vset2-up-R</i>	GGTAGGGAAGTGGTTAGGAAAGG
<i>Vset2-down-F</i>	TTTTGAGACACGGGCCAGAGCT
<i>Vset2-down-R</i>	TGGTACAATGCAGATTCTATC
<i>Vset2-in-F</i>	AACTGTGGTGGTGGCTGTC
<i>Vset2-in-R</i>	TGGATGACGCGCTCCTCGTGC
<i>OEset2-F</i>	GGTTGATACGACAGATATCATGGAGGATGAGGAGAACACGAC
<i>OEset2-R</i>	AAGCCCGGTCACGAAAGCCTCAATGGCCCAACAGCTCCTGC
<i>OEypr1-F</i>	GGTTGATACGACAGATATCATGGGGAGCAGCGCCACGGC
<i>OEypr1-R</i>	AAGCCCGGTCACGAAAGCCCTAGCCGTAATCTATGTAG
<i>P_{icu1}-F</i>	CCACAAGAGCCTACTGCCAAATC
<i>T_{cbh2}-R</i>	TAGACAAAGACTCCGCCAACC
<i>set2-qF</i>	CCAAGGAGGCTAAGAAGG
<i>set2-qR</i>	GTAATCGGACGCCACGAG
<i>ypr1-qF</i>	GTTCTACACACGACTTCCCATG
<i>ypr1-qR</i>	CCAGCCACTGATGTCGTATCC
<i>ypr2-qF</i>	GCTGCTTGAACAAATGGGAG
<i>ypr2-qR</i>	GCACATTCTTGAGGAGTTCG
<i>sor1-qF</i>	GGCCTTTGTTCTTCATGACTCC
<i>sor1-qR</i>	GTGAGCCAAGGCATCTTCG
<i>sor2-qF</i>	AGCTACTCAACAACGTGACGC
<i>sor2-qR</i>	ATCCCACTGCTGCTCAGGTAC
<i>sor3-qF</i>	CTTCGCTTGAGTGTTCCTCTG
<i>sor3-qR</i>	GGCAGCAACGATATAAGCGAG
<i>sor4-qF</i>	CCTGGTAGTGAGAAACACGG
<i>sor4-qR</i>	GGCCAACAGTCGGACATATC
<i>sor6-qF</i>	GTCTACATGTTCTGGGAGCC
<i>sor6-qR</i>	CAATGCTAACAGCCAGTGG
<i>actin-F</i>	TGAGAGCGGTGGTATCCACG
<i>actin-R</i>	GGTACCACCAGACATGACAATGTTG

1.4 Sorbicillinoids 产量分析

当里氏木霉转移至发酵培养基中进行培养后, 每隔 12 h 收集 1 mL 发酵液。13 000 r/min 离心 10 min 后取上清液保存于-80 °C 备用。待所有样品收集完毕后, 吸取 200 μ L 解冻的发酵液至 96 孔板中, 然后使用酶标仪在 370 nm 条件下测量吸收值。每个样品设置 3 个平行进行测量, 然后取平均值。

1.5 实时荧光定量 PCR

在指定的培养时间点收集里氏木霉菌丝, 并使用 Trizol 试剂(生工生物工程(上海)股份有限公司)提取总 RNA, 除去基因组 DNA 后经反转录试剂盒(TaKaRa)合成 cDNA。以 cDNA 作为模板使用荧光定量 PCR 仪(Thermo)对目标基因进行扩增。PCR 反应程序如下: 95 °C 预变性 30 s, 然后进行以下循环: 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火和延伸 30 s, 共进行 40 个循环。定量 PCR 数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 且所有样品使用 *actin* 基因作为内参进行校正。定量 PCR 引物见表 1。

1.6 蛋白序列分析与结构预测

本研究中所涉及的蛋白序列和基因序列来源于 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)或 JGI (<https://genome.jgi.doe.gov/>)数据库。蛋白质结构预测主要通过 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)数据库。

2 结果与分析

2.1 里氏木霉 TrSet2 的鉴定与分析

组蛋白翻译后修饰作为真核生物中重要的组蛋白密码在染色质水平参与调控基因功能。其中, 关于组蛋白 H3 翻译后修饰的研究最多且较为清楚, 尤其是甲基化和乙酰化修饰。组蛋白 H3 的第 36 位赖氨酸残基(H3K36)的甲基化修饰通常与真核生物转录活跃的基因密切相

关^[13]。当然, 也有一些报道表明 H3K36 的甲基化参与了基因转录抑制、RNA 的选择性剪切以及 DNA 损伤修复等过程^[14]。与其他高等真核生物不同, 真菌基因组中通常只有 1 个组蛋白 H3K36 甲基转移酶, 负责其单、双和三甲基化。为了在里氏木霉中鉴定 H3K36 甲基转移酶, 我们以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)编码的 H3K36 甲基转移酶 ScSet2 (GenBank: QHB09466.1)作为诱饵, 经过在里氏木霉基因组中比对筛选, 鉴定到其同源蛋白(Tr_80732), 并将其命名为 TrSet2。进一步的分析表明, 编码 TrSet2 的基因由 3 个外显子组成, 共编码 933 个氨基酸残基。比较酿酒酵母 ScSet2 和里氏木霉 TrSet2 蛋白的结构域表明, 两者均含有保守的 AWS、SET、Post_SET、WW 和 SRI 这 5 个结构域(图 1)。其中, SET 结构域是组蛋白 H3K36 甲基化的关键核心^[15]。SRI 结构域是负责与 RNA 聚合酶 II 的 Rpb1 亚基相互作用以参与基因的转录延伸过程^[16]。以上结果暗示着 Set2 在真菌中的功能是非常保守的。然而, 令人意外的是, 分析结果表明 TrSet2 还包含了一个 TFIIS_N 结构域(图 1)。TFIIS 是真核生物中功能非常保守的参与转录延伸的转录因子, TFIIS_N 结构域同样也在中介体复合物亚基 Med26 中被发现^[17]。鉴于中介体复合物在基因的转录起始和延伸过程中发挥重要的作用, 我们推测在长期的进化过程中里氏木霉 TrSet2 可能被赋予了比 ScSet2 更多的功能和角色。

2.2 里氏木霉 TrSet2 激活 sorbicillinoids 的生物合成

为了研究里氏木霉 TrSet2 在体内的生物学功能, 我们构建了该基因的敲除载体 pDONOR- $\Delta Trset2$, 然后转化到里氏木霉原生质体中, 经过多轮筛选和验证后获得了 $\Delta Trset2$ 菌株(图 2A 和 2B)。同时为了在里氏木霉中过表达 *Trset2* 基

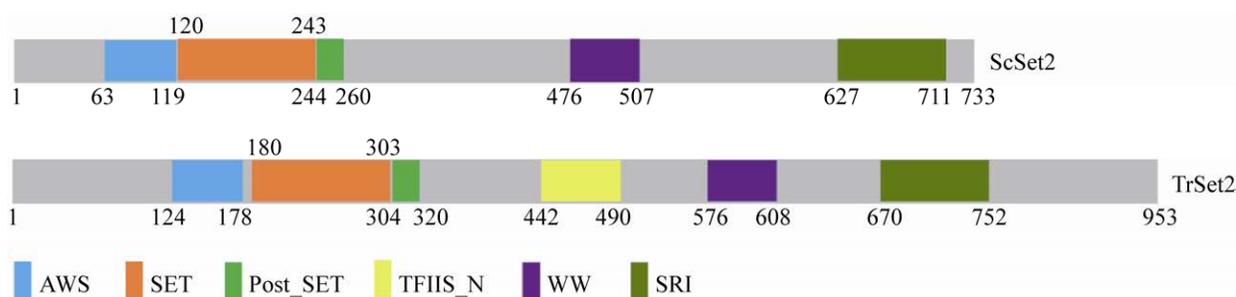


图 1 酿酒酵母 *Set2* (ScSet2)和里氏木霉 *Set2* (TrSet2)结构域比较分析

Figure 1 Comparative analysis of protein domains between ScSet2 and TrSet2 via InterPro. All predicted domains are marked with different color and their position are labeled. AWS (associated with SET); SRI (Set2 Rpb1 interacting); TFIS_N (N-terminal of TFIS).

因, 我们构建了 pOE-*Trset2* 质粒, 紧接着转入上述构建好的 $\Delta Trset2$ 菌株中, 经筛选和验证后获得 OE*Trset2* 菌株(图 2C-D)。为了进一步验证 *Trset2* 基因是否彻底被敲除或过表达, 我们对 $\Delta Trset2$ 和 OE*Trset2* 菌株中 *Trset2* 的 mRNA 水平进行了分析。结果与预期一致, 在 $\Delta Trset2$ 菌株中基本检测不到 *Trset2* 基因的表达, 而 OE*Trset2* 菌株中 *Trset2* 基因的表达水平远远高于对照菌株 QM9414 (图 2E)。

为了分析 TrSet2 对里氏木霉 *sorbicillinoids* 合成的影响, 我们将对照菌株 QM9414 及构建好的 $\Delta Trset2$ 和 OE*Trset2* 菌株预培养后, 等量地接种到以葡萄糖或纤维素为碳源的发酵培养基中进行 *sorbicillinoids* 合成水平分析。在培养过程中, 我们发现 $\Delta Trset2$ 基本丧失了合成 *sorbicillinoids* 的能力, 而过表达 *Trset2* 基因后, 里氏木霉合成 *sorbicillinoids* 的能力要显著高于对照菌株 QM9414 (图 3)。以上结果说明 TrSet2 在里氏木霉 *sorbicillinoids* 合成过程中起到激活调控的作用。此外, 在以纤维素为碳源的发酵培养基中进行培养时, $\Delta Trset2$ 和 OE*Trset2* 菌株的表型与在葡萄糖为碳源培养条件下的表型保持一致(图 3), 这说明在里氏木霉中 TrSet2 调控 *sorbicillinoids* 的合成并不依赖于碳源。

2.3 TrSet2 在转录水平调控 *sorbicillinoids* 的合成

里氏木霉 *sorbicillinoids* 的合成由 *sor* 基因簇负责, 该基因簇大约有 3 万个碱基, 共编码 8 个蛋白质。包括 1 个还原型的聚酮合酶 Sor1、1 个非还原型的聚酮合酶 Sor2、1 个 FAD 依赖的单加氧酶 Sor3、1 个 FAD/FMN 依赖的脱氢酶 Sor4、1 个短链脱氢酶 Sor5、1 个 MFS 家族的转运蛋白 Sor6 以及 2 个转录因子 Ypr1 和 Ypr2^[18](图 4A)。其中 Ypr1 是负责正向调控 *sor* 基因簇的转录激活因子, 而 Ypr2 主要负责抑制 Ypr1 的表达, 从而保证里氏木霉适时适量地合成 *sorbicillinoids*。

作为一个功能保守的甲基转移酶, 我们推测里氏木霉 TrSet2 可能在染色质水平调控 *sor* 基因簇的转录。为了验证这一猜想, 我们以葡萄糖为碳源培养 QM9414、 $\Delta Trset2$ 和 OE*Trset2* 菌株 36 h, 收集菌丝提取 RNA 后对 *sor* 基因簇上的基因进行转录水平分析。结果表明, 与对照菌株相比, $\Delta Trset2$ 菌株中 *sor* 基因簇上的基因表达水平显著降低。相反, OE*Trset2* 菌株中 *sor* 基因簇上的基因转录水平显著上调(图 4B)。以上结果说明, 里氏木霉 TrSet2 通过控制 *sor* 基因簇上基因的转录水平进而调控 *sorbicillinoids*

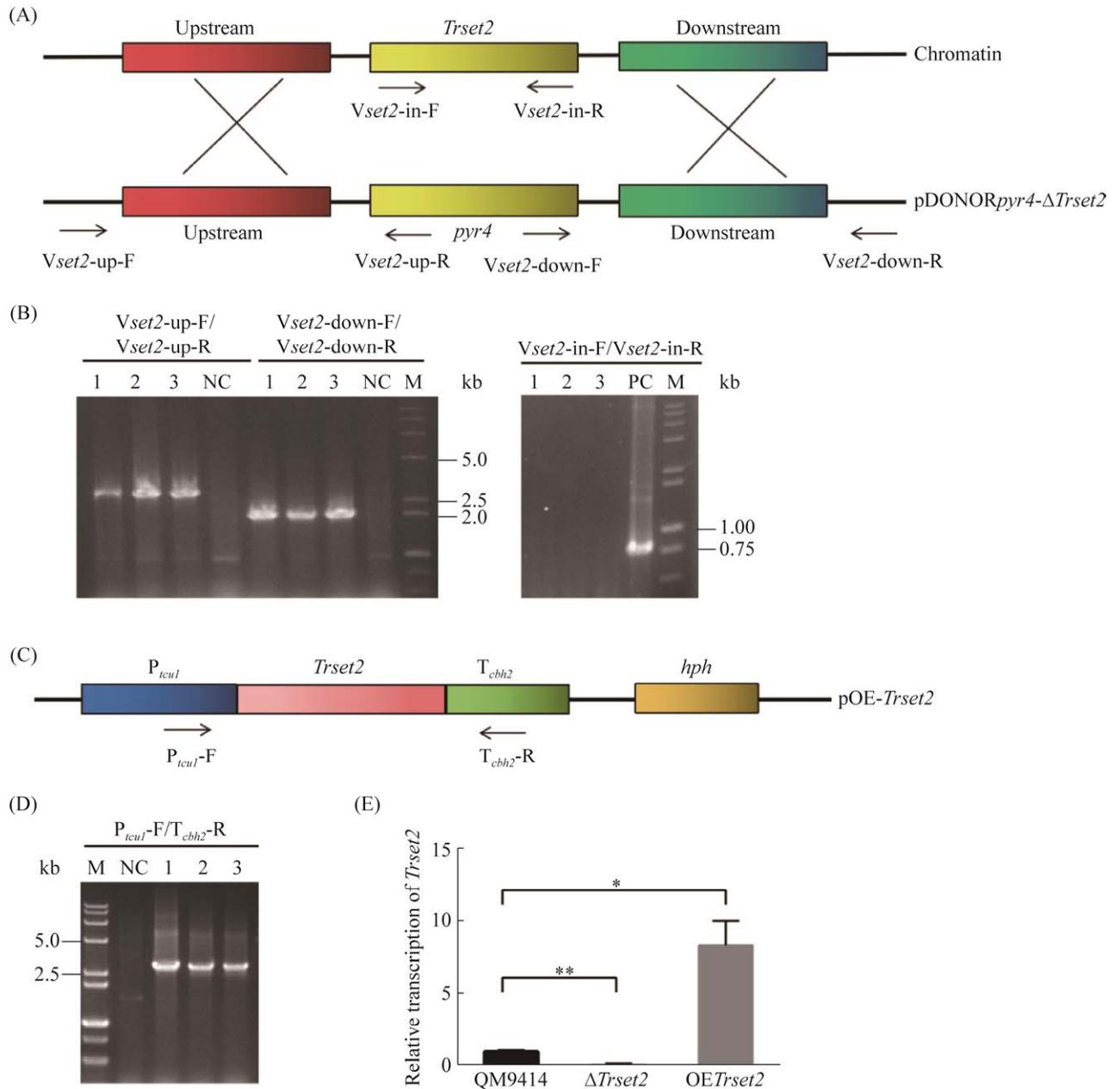


图 2 里氏木霉 *Trset2* 基因敲除和过表达菌株构建

Figure 2 Construction of $\Delta Trset2$ and OETrset2 strains, respectively, in *T. reesei*. A–B: schematic illustration of the *Trset2* knockout cassette pDONORpyr4- $\Delta Trset2$ (A) and PCR analyses of its integration into the genome of $\Delta Trset2$ using the primer pairs as indicated in Figure 2B; C–D: schematic illustration of the *Trset2* overexpression cassette pOE-*Trset2* (C) and PCR analyses of its integration into the genome of OETrset2 using the primer pairs as indicated in Figure 2D. Lane 1–3: PCR products with genomic DNA of three independent $\Delta Trset2$ or OETrset2 transformants as template; Lane PC and NC: PCR products with genomic DNA of control strain QM9414 as template; Lane M: commercial DNA marker. E: transcriptional analysis of *Trset2* in $\Delta Trset2$, OETrset2, and the control stain cultured on 1% (*W/V*) glucose. Statistical analysis was performed using the Student's *t* test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$) analysis.

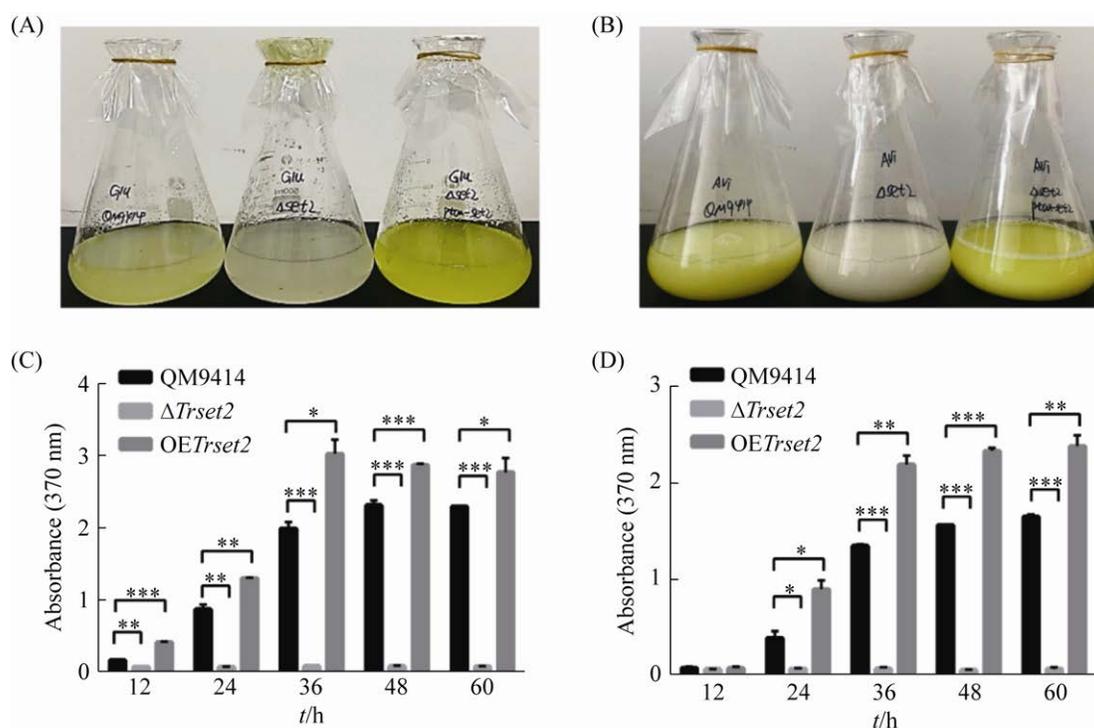


图 3 $\Delta Trset2$ 和 OETrset2 菌株合成 sorbicillinoids 能力分析

Figure 3 Quantitative analysis of sorbicillinoid synthesis in $\Delta Trset2$ and OETrset2 strains. A–B: captured image of sorbicillinoid production about $\Delta Trset2$, OETrset2, and the control stains after cultivation of 36 h with 1% (*W/V*) glucose (A) or cellulose (B) as carbon source. C–D: quantitative analysis of sorbicillinoid synthesis in $\Delta Trset2$, OETrset2, and the control stain cultured on 1% (*W/V*) glucose (C) or cellulose (D) at indicated time points. Statistical analysis was performed using the Student's *t* test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$) analysis.

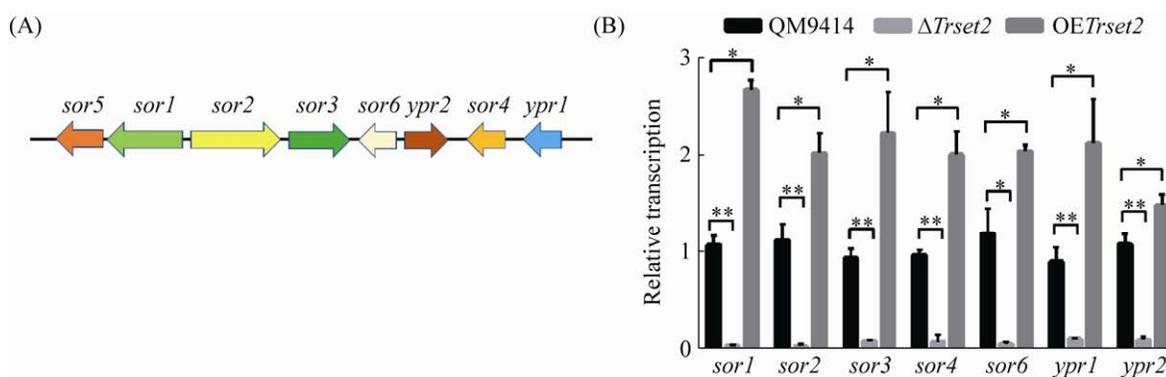


图 4 TrSet2 在转录水平调控 *sor* 基因簇的表达

Figure 4 TrSet2 regulated the expression of *sor* gene cluster at the transcriptional level. A: schematic diagram of the *sor* gene cluster in *T. reesei* genome; B: the mRNA abundance of the genes in *sor* gene cluster was investigated by RT-qPCR after cultivation on 1% (*W/V*) glucose for 36 h. The *actin* was selected as a reference gene and its transcription level was used for normalization in all samples. Statistical analysis was performed using the Student's *t* test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$) analysis.

的合成。此外, 我们的实验结果显示, *sor* 基因簇中 *sor5* 基因在以上菌株中均不能被检测到。之前的文献也有类似的报道, 详细的原因仍需进一步的调查^[5]。

2.4 过表达 Ypr1 逆转了 $\Delta Trset2$ 菌株不能合成 sorbicillinoids 的表型

Ypr1 是负责 *sor* 基因簇转录激活的蛋白质因子。已有研究表明, 敲除 *ypr1* 基因可导致里氏木霉无法合成 sorbicillinoids, 而过表达 Ypr1 后, 里氏木霉 sorbicillinoids 的合成大幅度提高。在我们的研究中发现, 伴随着 sorbicillinoids 合成的消失, $\Delta Trset2$ 菌株中转录因子 *ypr1* 的表达显著下调。而在 OETrset2 菌株中, 不仅 sorbicillinoids 的合成显著增加, *ypr1* 的转录水平同样明显提升。以上表型暗示着, TrSet2 可能通过控制转录因子 Ypr1 的表达进而控制里氏木霉 sorbicillinoids 的合成。为了验证猜想, 我们构建了转录因子 Ypr1 过表达载体 pOE-*ypr1* 并转化 $\Delta Trset2$ 菌株, 经筛选后获得 $\Delta Trset2$ &OEypr1 菌株(图 5A–B)。紧接着, 我们

将 $\Delta Trset2$ 、 $\Delta Trset2$ &OEypr1 和对照菌株 QM9414 在发酵培养基上分别进行培养。结果表明, 无论是在以葡萄糖还是以纤维素为碳源的培养基中, $\Delta Trset2$ &OEypr1 菌株均可以大量合成 sorbicillinoids, 甚至超过对照菌株(图 6A–D)。转录水平分析也证明, $\Delta Trset2$ &OEypr1 菌株中 *sor* 基因簇上基因的表达也显著提升并高于对照菌株(图 6E)。以上结果说明, 过表达 Ypr1 完全逆转了 $\Delta Trset2$ 不能合成 sorbicillinoids 的表型, 暗示着 TrSet2 可以通过控制 Ypr1 的表达进而调控里氏木霉 sorbicillinoids 的合成。

3 讨论

本研究在里氏木霉中鉴定了 1 个组蛋白 H3K36 甲基转移酶 TrSet2, 并在里氏木霉中对其进行敲除和过表达。研究表明, TrSet2 可以正向调控里氏木霉天然活性物质 sorbicillinoids 的合成。且构建的 TrSet2 过表达基因工程菌株, 显著提升了 sorbicillinoids 的产量。因为在 $\Delta Trset2$ 菌株中 *sor* 基因簇转录激活因子 Ypr1

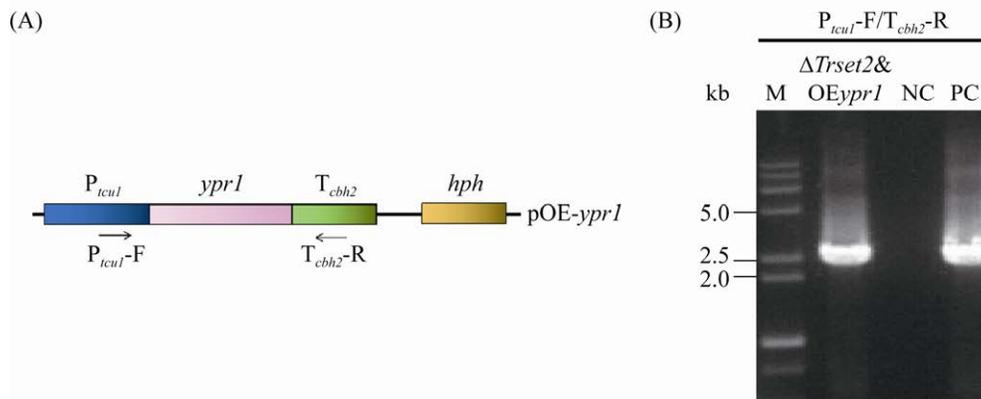


图 5 里氏木霉 $\Delta Trset2$ &OEypr1 菌株的构建与筛选

Figure 5 Construction and screening of *T. reesei* $\Delta Trset2$ &OEypr1 strain. A: schematic illustration of the *ypr1* overexpression cassette pOE-*ypr1*; B: PCR analyses of pOE-*ypr1* integration into the genome of $\Delta Trset2$ &OEypr1 using the primer pairs as indicated in Figure 5A. Lane NC: PCR products with genomic DNA of control strain QM9414 as template. Lane PC: PCR products with the plasmid pOE-*ypr1* as template; lane M: commercial DNA marker.

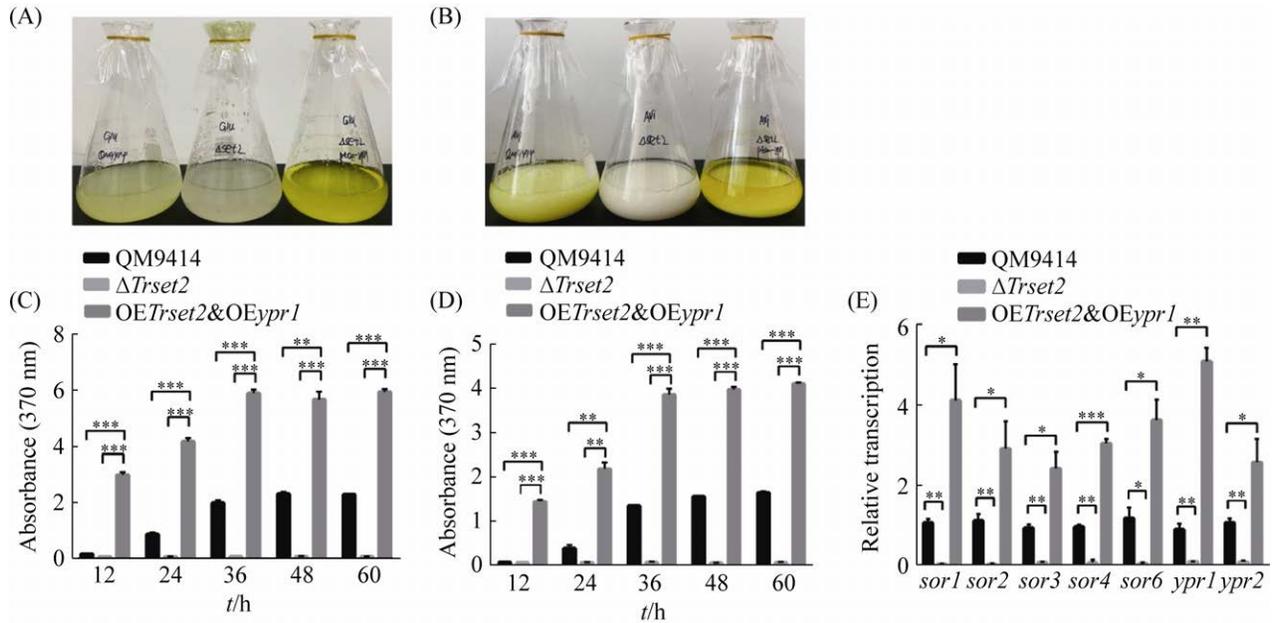


图 6 $\Delta Trset2$ 菌株中过表达 *ypr1* 基因恢复了 sorbicillinoids 的合成

Figure 6 Overexpression of Ypr1 in $\Delta Trset2$ strain restored the sorbicillinoid synthesis. A–B: captured image of sorbicillinoid production about $\Delta Trset2$, $\Delta Trset2\&OEYpr1$, and the control stains after cultivation of 36 h with 1% (*W/V*) glucose (A) or cellulose (B) as carbon source; C–D: quantitative analysis of sorbicillinoid synthesis in $\Delta Trset2$, $\Delta Trset2\&OEYpr1$, and the control stains cultured on 1% (*W/V*) glucose (C) or cellulose (D) at indicated time points; E: the mRNA abundance of the genes in *sor* gene cluster was investigated by RT-qPCR after cultivation on 1% (*W/V*) glucose for 36 h. The *actin* was selected as a reference gene and its transcription level was used for normalization in all samples. Statistical analysis was performed using the Student's *t* test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$) analysis.

的表达显著下调,且在 $\Delta Trset2$ 菌株中过表达转录激活因子 Ypr1 后,完全逆转了 $\Delta Trset2$ 菌株不能合成 sorbicillinoids 的表型。所以我们推测 TrSet2 可以作为一个上游调控因子通过控制 Ypr1 的表达水平进而调控 sorbicillinoids 的合成。尽管如此,TrSet2 是否直接调控 Ypr1 的表达依然不清楚。

另外,我们也发现在 $\Delta Trset2$ 菌株中转录抑制因子 Ypr2 的表达显著下调,而在 OETrset2 菌株中它的表达却明显上升。多项研究表明,敲除 Ypr2 后里氏木霉 Ypr1 的表达上调,而敲除 Ypr1 后, Ypr2 的表达明显下降。这暗示着里氏木霉 Ypr1 和 Ypr2 的表达是互相制约的,且 Ypr2 可能作为负反馈机制中的一个关键角

色,通过控制 Ypr1 的表达水平进而保证 sorbicillinoids 的合成处在合理水平。即当 Ypr1 的表达上调导致 sorbicillinoids 的合成过多时, Ypr1 同时可上调 Ypr2 的表达进而抑制自身的转录使 sorbicillinoids 的合成回归至合理水平。因此,我们推测 $\Delta Trset2$ 菌株中 Ypr1 的表达下调是导致 Ypr2 表达下降的主要原因。而在 OETrset2 菌株中, Ypr2 的表达伴随着 Ypr1 的上调而升高。

除此之外,TrSet2 是否也可以通过别的通路调控 sorbicillinoids 的合成仍有待于进一步的研究。我们的研究结果有助于阐明里氏木霉复杂的 *sor* 基因簇调控网络,对于控制里氏木霉纤维素酶生产过程中的色素水平,降低下游纯

化工艺难度, 节约生产成本意义重大。同时, 对于基于调控机理构建高水平合成 sorbicillinoids 的基因重组菌株, 开发基于 sorbicillinoids 分子的药物产品等也具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] Katz L, Baltz RH. Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2016, 43(2/3): 155–176.
- [2] Meng JJ, Wang XH, Xu D, Fu XX, Zhang XP, Lai DW, Zhou LG, Zhang GZ. Sorbicillinoids from fungi and their bioactivities. *Molecules: Basel, Switzerland*, 2016, 21(6): 715.
- [3] Pang XY, Zhou XF, Lin XP, Yang B, Tian XP, Wang JF, Xu SH, Liu YH. Structurally various sorbicillinoids from the deep-sea sediment derived fungus *Penicillium* sp. SCSIO06871. *Bioorganic Chemistry*, 2021, 107: 104600.
- [4] Wang L, Zhang WX, Cao YL, Zheng FL, Zhao GL, Lv XX, Meng XF, Liu WF. Interdependent recruitment of *CYC8/TUPI* and the transcriptional activator *XYR1* at target promoters is required for induced cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *PLoS Genetics*, 2021, 17(2): e1009351.
- [5] Li CC, Lin FM, Sun W, Yuan SX, Zhou ZH, Wu FG, Chen Z. Constitutive hyperproduction of sorbicillinoids in *Trichoderma reesei* ZC121. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 291.
- [6] 安宁. Sorbicillinoids 类黄色色素在里氏木霉生长发育、压力响应及纤维素酶表达中的作用. 山东大学硕士学位论文, 2018.
- [7] Pfannenstiel BT, Keller NP. On top of biosynthetic gene clusters: how epigenetic machinery influences secondary metabolism in fungi. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(6): 107345.
- [8] Collemare J, Seidl MF. Chromatin-dependent regulation of secondary metabolite biosynthesis in fungi: is the picture complete? *FEMS Microbiology Reviews*, 2019, 43(6): 591–607.
- [9] Derntl C, Rassinger A, Srebotnik E, Mach RL, Mach-Aigner AR. Identification of the main regulator responsible for synthesis of the typical yellow pigment produced by *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(20): 6247–6257.
- [10] Zhang WX, An N, Guo JQ, Wang ZX, Meng XF, Liu WF. Influences of genetically perturbing synthesis of the typical yellow pigment on conidiation, cell wall integrity, stress tolerance, and cellulase production in *Trichoderma reesei*. *Journal of Microbiology: Seoul, Korea*, 2021, 59(4): 426–434.
- [11] Wang L, Zheng FL, Zhang WX, Zhong YH, Chen GJ, Meng XF, Liu WF. A copper-controlled RNA interference system for reversible silencing of target genes in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 33.
- [12] Zhang WX, Kou YB, Xu JT, Cao YL, Zhao GL, Shao J, Wang H, Wang ZX, Bao XM, Chen GJ, Liu WF. Two major facilitator superfamily sugar transporters from *Trichoderma reesei* and their roles in induction of cellulase biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(46): 32861–32872.
- [13] Wagner EJ, Carpenter PB. Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, 13(2): 115–126.
- [14] McDaniel SL, Strahl BD. Shaping the cellular landscape with Set2/SETD2 methylation. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 2017, 74(18): 3317–3334.
- [15] Freitag M. Histone methylation by SET domain proteins in fungi. *Annual Review of Microbiology*, 2017, 71: 413–439.
- [16] Kizer KO, Phatnani HP, Shibata Y, Hall H, Greenleaf AL, Strahl BD. A novel domain in Set2 mediates RNA polymerase II interaction and couples histone H3K36 methylation with transcript elongation. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(8): 3305–3316.
- [17] Ling Y, Smith AJ, Morgan GT. A sequence motif conserved in diverse nuclear proteins identifies a protein interaction domain utilised for nuclear targeting by human TFIIS. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(8): 2219–2229.
- [18] Derntl C, Guzmán-Chávez F, Mello-De-Sousa TM, Busse HJ, Driessen AJM, Mach RL, Mach-Aigner AR. *In vivo* study of the sorbicillinoid gene cluster in *Trichoderma reesei*. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2037.

(本文责编 张晓丽)