



蛹虫草磷酸甲羟戊酸激酶和焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶基因的功能分析

闫欢欢^{1,2}, 尚怡彤^{1,2}, 王丽红^{1,2}, 田学琴^{1,2}, 姚丽华¹, 曾斌^{2,3*}, 胡志宏^{1,2*}

- 1 江西科技师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330013
- 2 江西科技师范大学 江西省生物加工过程重点实验室, 江西 南昌 330013
- 3 深圳技术大学药学院, 广东 深圳 518118

闫欢欢, 尚怡彤, 王丽红, 田学琴, 姚丽华, 曾斌, 胡志宏. 蛹虫草磷酸甲羟戊酸激酶和焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶基因的功能分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(2): 461-472.

YAN Huanhuan, SHANG Yitong, WANG Lihong, TIAN Xueqin, YAO Lihua, ZENG Bin, HU Zhihong. Functions of genes encoding phosphomevalonate kinase and mevalonate diphosphate decarboxylase in *Cordyceps militaris*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(2): 461-472.

摘要:【目的】确定蛹虫草甲羟戊酸途径中的 2 个关键酶——磷酸甲羟戊酸激酶(CmErg8)和焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶(CmErg19)的功能及其对麦角甾醇和虫草素含量的影响。【方法】通过生物信息学分析鉴定蛹虫草中 *CmErg8* 和 *CmErg19*, 并采用酵母互补确定其功能是否保守; 以蛹虫草尿嘧啶营养缺陷型 *CmΔpyrG* 为背景菌株, 利用农杆菌介导的转化方法对 *CmErg8* 和 *CmErg19* 进行过表达, 观察其对麦角甾醇和虫草素含量的影响。【结果】*CmErg8* 和 *CmErg19* 不能互补酵母 *erg8* 和 *erg19* 突变体的温度敏感表型; *CmErg8* 和 *CmErg19* 过表达菌株中麦角甾醇和虫草素含量均有所增加, 特别是 *CmErg19* 基因过表达可以使虫草素含量提升 5 倍左右。【结论】本研究揭示了蛹虫草 *CmErg8* 和 *CmErg19* 的功能, 并且发现蛹虫草麦角甾醇合成通路基因可能会影响虫草素含量。

关键词: 蛹虫草; 磷酸甲羟戊酸激酶; 焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶; 麦角甾醇; 虫草素

资助项目: 江西省科技厅自然科学基金(20212BAB205001); 国家自然科学基金(32260009, 31960193); 江西省“双千计划”(jxsq2019201011)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangxi Provincial Department of Science and Technology (20212BAB205001), the National Natural Science Foundation of China (32260009, 31960193), and the “Double Thousand Plan” in Jiangxi Province (jxsq2019201011).

*Corresponding authors. E-mail: HU Zhihong, huzhihong426@163.com; ZENG Bin, zengtx001@aliyun.com

Received: 2023-05-15; Accepted: 2023-11-17; Published online: 2023-11-23

Functions of genes encoding phosphomevalonate kinase and mevalonate diphosphate decarboxylase in *Cordyceps militaris*

YAN Huanhuan^{1,2}, SHANG Yitong^{1,2}, WANG Lihong^{1,2}, TIAN Xueqin^{1,2}, YAO Lihua¹, ZENG Bin^{2,3*}, HU Zhihong^{1,2*}

1 College of Life Sciences, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, Jiangxi, China

2 Jiangxi Key Laboratory of Bioprocess Engineering, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, Jiangxi, China

3 College of Pharmacy, Shenzhen Technology University, Shenzhen 518118, Guangdong, China

Abstract: [Objective] To determine the functions of two key enzymes of the mevalonate pathway, phosphomevalonate kinase (CmErg8) and mevalonate diphosphate decarboxylase (CmErg19), in *Cordyceps militaris* and their effects on the content of ergosterol and cordycepin. [Methods] Bioinformatics analysis was conducted to identify *CmErg8* and *CmErg19* in *C. militaris*, and yeast complementation was employed to determine whether their functions were conserved. Furthermore, we employed *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation to overexpress *CmErg8* and *CmErg19* in the auxotrophic mutant *CmΔpyrG* of *C. militaris*, so as to observe the effects of *CmErg8* and *CmErg19* on the content of ergosterol and cordycepin. [Results] *CmErg8* and *CmErg19* could not complement the temperature sensitivity of the *erg8* and *erg19* mutants of yeast. The strains overexpressing *CmErg8* and *CmErg19* showed increased content of ergosterol and cordycepin. Particularly, the cordycepin content increased by about 5 times in the strain overexpressing *CmErg19* compared with that in the control. [Conclusion] This study revealed the functions of *CmErg8* and *CmErg19* in *C. militaris* and reported that the genes in the ergosterol synthesis pathway of *C. militaris* affected the content of cordycepin for the first time. **Keywords:** *Cordyceps militaris*; phosphomevalonate kinase; mevalonate diphosphate decarboxylase; ergosterol; cordycepin

磷酸甲羟戊酸激酶 (phosphomevalonate kinase, PMK) 和焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶 (mevalonate diphosphate decarboxylase, MVD) 是合成类固醇、类萜等生物分子的甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 途径关键酶, PMK 是 MVA 途径的第 5 个关键酶, 也是 MVA 途径中依赖 ATP 的第 2 个限速酶, 其功能是将 ATP 上的 γ 位磷酸基团转移到甲羟戊酸-5-磷酸上生成甲羟戊酸-5-二磷酸^[1]。MVD 是 MVA 途径上游 PMK 后的另一个关键酶, 催化六碳甲羟戊酸 5-二磷酸的脱羧反应, 生成五碳异戊二磷酸, 这是生物合

成重要的细胞中间体类异戊二烯所需的基本结构^[2-3]。在真菌中, MVA 途径位于麦角甾醇合成通路的上游, 因此 PMK 和 MVD 分别被称为 *Erg8* 和 *Erg19*, 是麦角甾醇生物合成途径中的关键基因^[4-5]。麦角甾醇是真菌细胞膜的重要组成部分^[6], 可以影响细胞膜流动性和渗透性, 在真菌的生长、繁殖和抗应激中起重要作用^[7]。

PMK 和 MVD 在不同的生物包括植物、动物和微生物中都起着重要作用^[8]。目前, 关于 PMK 和 MVD 的研究大多集中于植物, 如在香樟 (*Cinnamum camphora*) 中 PMK 存在 5 种化学

型^[9]; 在人参(*Panax ginseng*)的萜类化合物生物合成中 PMK 和 MVD 起着重要的作用^[10]; 在檀香(*Santalum album*)中 PMK 可能参与了对环境刺激的信号分子相关响应^[11]; 在紫苏(*Perilla frutescens* L.)中 PMK 参与了紫苏萜类物质的生物合成^[12]。在真菌中, 研究发现白色念珠菌和米曲霉的 MVD 能够有效地补充缺乏 MVD 活性的酿酒酵母突变株^[3,13]; 米曲霉 *AoErg19* 的过表达和 RNAi 均降低了麦角甾醇的含量^[3]。

蛹虫草(*Cordyceps militaris*)作为具有多种生物功能的食用药用真菌, 其在 MVA 合成通路参与酶的相关研究仍较少。蛹虫草含有多种重要的生物学成分, 如麦角甾醇、虫草素、多糖等^[14-15], 使蛹虫草具有抗癌、抗肿瘤、抗炎和抗氧化活性^[16-18]。人们常把蛹虫草作为冬虫夏草的替代品进行开发利用^[19-20]。目前尚未有 PMK 和 MVD 在蛹虫草中的功能研究。本研究通过对基因 *CmErg8*、*CmErg19* 进行克隆并过表达, 以揭示其功能, 结果发现这 2 个基因的过表达可以提高麦角甾醇含量和虫草素含量, 特别是 *CmErg19* 过表达可以将虫草素含量提高 5 倍。本研究为蛹虫草麦角甾醇代谢通路相关基因的研究奠定了基础, 并且为通过基因工程提高蛹虫草的虫草素含量提供了新途径。

1 材料与方法

1.1 菌株

本研究使用蛹虫草野生型菌株 *C. militaris* (由本实验室保存提供)提取 DNA, 蛹虫草营养缺陷型 *CmΔpyrG* 由本实验室前期构建^[21], 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) AGL1 分别用来构建目的质粒和真菌转化。

1.2 蛹虫草基因组 *Erg8* 和 *Erg19* 系统发育鉴定

以米曲霉(*Aspergillus oryzae*)和酿酒酵母的

PMK 和 MVD 序列为参考序列^[6], 使用 NCBI 查询蛹虫草 *Cm01* 菌株磷酸甲羟戊酸激酶(PMK)和焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶(MVD)的蛋白序列以及其他物种中的同源序列。分别对不同生物的 PMK 和 MVD 进行系统发育分析, PMK 序列包括黄花蒿(PWA75498.1、PWA41879.1、PWA45041.1)、人参(AGZ15314.1)、丹参(AEZ55665.1)、番茄(NP_001352984.1)、水稻(XP_015691178.1)、海枣(XP_008788523.1)、地钱(PTQ31721.1)、小立碗蕨(XP_024377116.1)、卷柏(XP_024543893.1)、蜜环菌(PBK91655.1)、米曲霉(EIT75656.1)、白色念珠菌(KHC77020.1)、酿酒酵母(AAA34596.1、PJP11142.1)、植物乳杆菌(WP_054399164.1)、熊蜂(NP_001267845.1)、桑蚕(NP_001040145.1)、人类(AAC37593.1)和小鼠(Q9D1G2.3); MVD 序列来自水稻 MVD1 (XP_025878908.1)、水稻 MVD2 (XP_015626692.1)、玉米(AQK75765.1)、拟南芥(OAP02434.1)、斑马鱼(NP_001007423.1)、人类(NP_002452.1)、小鼠(NP_619597.2)、白色念珠菌(KAF6070125.1)、白色念珠菌 MVD1 (AAF19399.1)、酿酒酵母(GFP67416.1)、黑曲霉(GKZ58314.1)、黄曲霉(KOC09534.1)、米曲霉(XP_001821363.1)、乳酸杆菌(WP_035455896.1)、大肠杆菌(HAP2020178.1)和金黄色葡萄球菌(OLF28735.1)。利用 MEGA-X 使用邻接(neighbor-joining)法^[22]对所选氨基酸序列进行系统发育分析, 构建系统进化树, 并使用 DNAMAN 软件^[21]对不同物种的 PMK 和 MVD 蛋白分别进行多序列比对, 分析氨基酸序列的一致性。

1.3 酵母中 *CmErg8*、*CmErg19* 功能互补

酵母 *erg8* (Y40835)和 *erg19* (Y41208)突变体购自 European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis (<http://www.euroscarf.de/index.php>), 以酵母菌株 BY4741 为野生型对照。质粒 pYES2.0-*CmErg8* 和 pYES2.0-*CmErg19*

分别含有由 GAL1 启动子控制的 *CmErg8* 和 *CmErg19* 全长编码序列 (coding sequences, CDS)。分别使用引物 pYES2.0-*CmErg8* F/R 和引物 pYES2.0-*CmErg19* F/R 扩增 *CmErg8* 和 *CmErg19* 的 CDS (引物序列见表 1), 并使用 *EcoR* I 和 *Hind* III 限制性内切酶对 pYES2.0 载体进行线性化, 通过一步连接法将目的片段和线性化后的载体连接 (ClonExpress II One Step Cloning Kit, 诺唯赞生物科技股份有限公司), 并进行测序验证。然后, 将 pYES2.0-*CmErg8* 和 pYES2.0-*CmErg19* 载体通过热激法转化到对应酵母突变体中^[23]。对照和转化子分别在酵母浸出粉胨葡萄糖 (yeast extract peptone dextrose, YPD) 培养基 (1% 酵母浸膏, 2% 蛋白胨, 2% 葡萄糖) 和 YPG (1% 酵母浸膏, 2% 蛋白胨, 2% 半乳糖) 上生长, 在 30 °C 和 37 °C 下分别观察表型。此外, 在 30 °C 下使用液体 YPG 培养基培养对照和转化子, 振荡培养 2 d 后, 测定其麦角甾醇含量。

1.4 *CmErg8* 和 *CmErg19* 过表达

基因过表达载体使用二元载体 IF-pEX1^[21]。以蛹虫草野生型 DNA 为模板 PCR 扩增 *CmErg8* 基因片段 (1 329 bp), 并使用 *Kpn* I 单酶切二元载体 IF-pEX1, 基因片段与线性化载体使用重组酶进行一步连接, 构建 IF-*CmErg8* 载体。载体

IF-*CmErg19* (*CmErg19* 片段 1 167 bp) 的构建同 IF-*CmErg8* 载体一致。构建好的载体通过热激法转化根癌农杆菌 AGL1, 进一步利用农杆菌介导转化法^[24]转化蛹虫草 *CmΔpyrG*^[21] 菌株, 使用察氏 (Czapek dox, CD) 培养基^[23] 进行筛选。转化子接种于葡萄糖肉汤酵母 (dextrose peptone yeast, DPY) 培养基 (2% 葡萄糖, 1% 蛋白胨, 0.5% 酵母浸膏, 0.5% KH_2PO_4 , 0.05% MgSO_4), 22 °C 培养 10–12 d, 收集菌丝备用。

1.5 荧光观察

将蛹虫草过表达阳性菌株在 CD 培养基爬片培养 5–8 d, 使用荧光显微镜 (Leica 公司) 分别在 20 倍和 63 倍镜下观察荧光。

1.6 蛹虫草 *CmErg8* 和 *CmErg19* 基因转录水平的检测

将蛹虫草在 DPY 琼脂培养基 22 °C 培养 10 d 后, 用快速 RNA 小量提取试剂盒提取对照和过表达菌株的 RNA, 然后用 HiScript III RT SuperMix for qPCR 试剂盒 (诺唯赞生物科技股份有限公司) 反转录获得 cDNA, 用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (诺唯赞生物科技股份有限公司) 进行实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR), 以 *CmGPD* 基因作为内参基因, qRT-PCR 所用引物见表 1。

表 1 构建载体所用引物

Table 1 Primers used for vector construction

Name	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
IF- <i>CmErg8</i>	CTCGAGTACGTAGGTACCATGCCGACTCATC CCAACGT	CCCTTGCTCACCATGGTACCTGACAGCCATCC GTCGTACA
IF- <i>CmErg19</i>	CTCGAGTACGTAGGTACCATGGCTGACACCA AAGTCTA	CCCTTGCTCACCATGGTACCTCGCTTGGCAGT CTCGCCGT
pYES2.0- <i>CmErg8</i>	CTATAGGGAATATTAAGCTTATGCCGACTCAT CCAACGT	GATGGATATCTGCAGAATTCTGACAGCCATCC GTCGTACA
pYES2.0- <i>CmErg19</i>	CTATAGGGAATATTAAGCTTATGGCTGACACC AAAGTCTA GCAACGCCGTCGAGCACAA	GATGGATATCTGCAGAATTCTCGCTTGGCAGT CTCGCCGT AAAACACCCGTGGGAGGAGTCATAC
qRT- <i>CmErg8</i>	TGCAAGTGGGAGACCAAATAC	TTGTTCGCAAGGATGATGAG
qRT <i>CmErg19</i>	TACCTTCCCTCCCATCTTCTAC	CATCAAAGGTGTAAGCAGCAATAG

1.7 麦角甾醇、虫草素测定

麦角甾醇的提取和测定参考文献[23]。收集培养 10–12 d 的蛹虫草菌丝, 充分研磨并使用乙醇氢氧化钾溶液提取麦角甾醇, 所提取样品用高效液相色谱 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 分析。每个实验重复 3 次。使用甲醇超声法提取虫草素, 精密称取蛹虫草菌体粉末 0.2 g, 蛹虫草粉末与甲醇料液比 1:20 (蛹虫草 0.2 g, 甲醇 4 mL), 涡旋振荡 30 s, 采用超声波 400 W 功率提取 20 min, 共提取 3 次, 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后置于样品瓶中。虫草素的液相色谱条件如下, 色谱柱: C18 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm), 柱温: 35.0 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积 10 μL , 流动相-A-甲醇; B-水。等度洗脱: 12%甲醇+88%水, 洗脱速率为 1.0 mL/min, 检测器为紫外 (ultraviolet, UV), 波长 260 nm。每个实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 *CmErg8*、*CmErg19* 在不同生物体内具有进化保守性

为了研究 PMK 和 MVD 在蛹虫草中的功能, 以米曲霉和酿酒酵母的 PMK 和 MVD 蛋白序列为参考^[6], 在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中对蛹虫草基因组中 PMK 和 MVD 相应的同源蛋白进行 BLAST 分析, 蛋白质序列比对表明 PMK 和 MVD 在植物、动物、真菌和细菌中是保守的, PMK 一致性为 43%, 而 MVD 的一致性高达 75.2%。系统发育树分析表明, 在真菌中, 蛹虫草 PMK 与米曲霉在同一分支 (图 1A), MVD 则与米曲霉、黄曲霉和黑曲霉处于不同分支 (图 1B), 并且蛹虫草的 PMK 和 MVD 与酿酒酵母对

应的基因均不在同一分支。因此, 蛹虫草基因组中存在单个保守的 PMK 和 MVD。

2.2 酵母功能互补

在蛹虫草中 PMK 和 MVD 是麦角甾醇合成通路中的酶, 它们分别对应酵母中的 *Erg8* 和 *Erg19*, 因此将其命名为 *CmErg8* 和 *CmErg19*。酿酒酵母突变体 *erg8* (Y40835) 和 *erg19* (Y41208) 相较于野生型, 麦角甾醇含量降低, 且对温度敏感, 在高温下不能生长^[11,13]。为了确定 *CmErg8* 和 *CmErg19* 的功能是否保守, 将 *CmErg8* 和 *CmErg19* 的全长 CDS 克隆到酵母表达载体 pYES2.0 中, 转化到对应的 *erg8* 和 *erg19* 突变体中。由于 pYES2.0 含有半乳糖诱导的 GAL1 启动子, 所有转化子的表型分别在 30 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 YPD (含葡萄糖) 和 YPG (含半乳糖作为诱导物) 培养基上观察, 以确定是否恢复 *erg8* 和 *erg19* 的温度敏感表型。结果表明, 37 $^{\circ}\text{C}$ 时, YPD 和 YPG 上的酵母 *erg8* 和 *erg19* 突变是致死的, *CmErg8/erg8* 和 *CmErg19/erg19* 转化子均不能恢复突变体温度敏感表型 (图 2A、2B)。此外, 对 30 $^{\circ}\text{C}$ 液体培养对照和转化子的麦角甾醇含量进行测定, 结果显示, 转化子 *CmErg8/erg8* 和 *CmErg19/erg19* 的麦角甾醇含量均低于对照, 且较对应的突变体没有显著变化 (图 2C)。因此, *CmErg8* 和 *CmErg19* 均不能恢复对应酵母突变体温度敏感表型和麦角甾醇含量。

2.3 过表达

将携带 *pyrG* 标记和绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的二元载体 IF-*Erg8*、IF-*Erg19* 通过农杆菌转化的方法分别转化到蛹虫草 *Cm Δ pyrG* 营养缺陷型菌株中, 使用 IF-pEX1 空载体作为对照。蛹虫草 IF-pEX1、IF-*Erg8*、IF-

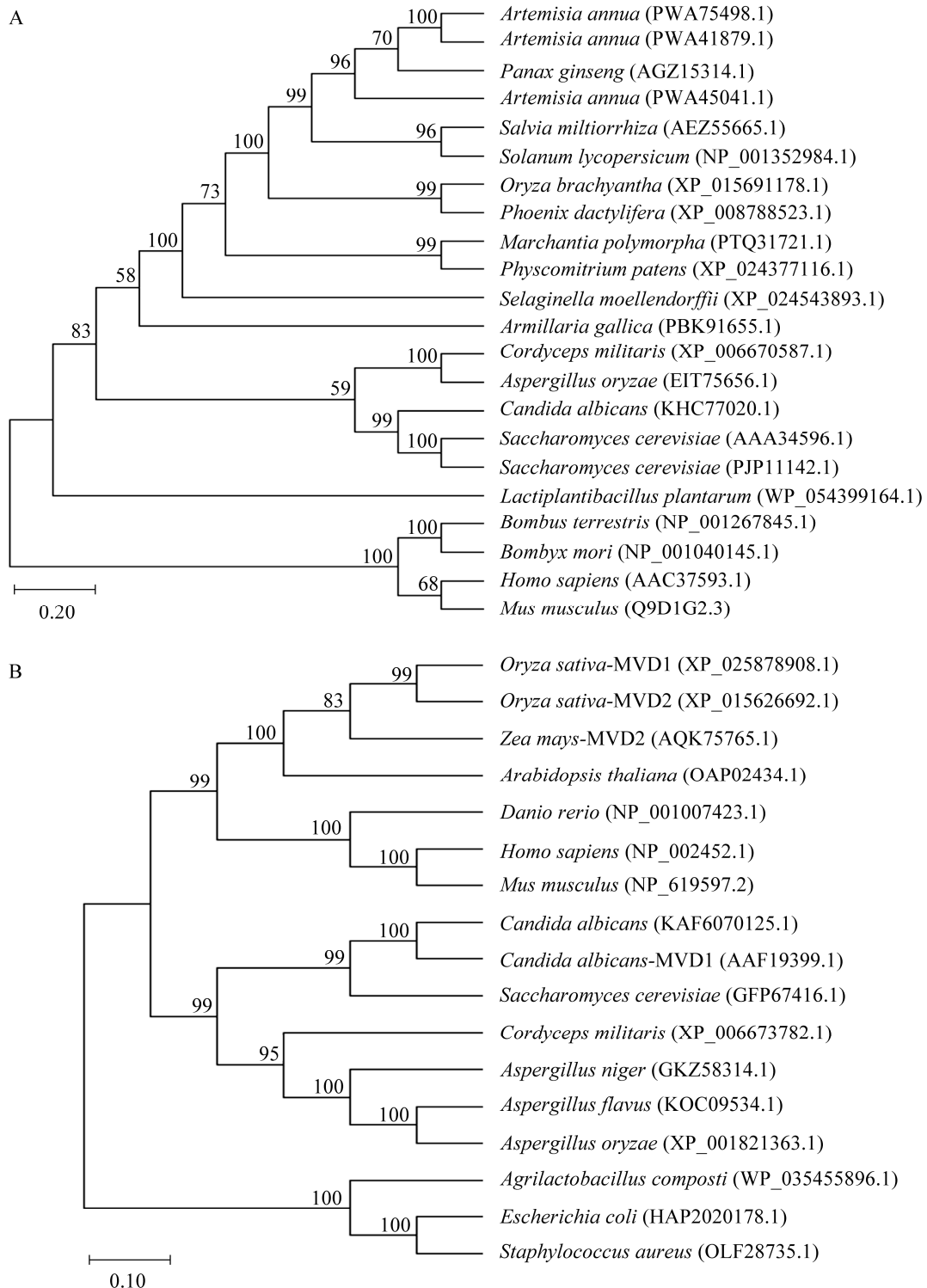


图 1 不同物种 PMK 和 MVD 的系统发育分析及氨基酸序列比对

Figure 1 Phylogenetic analysis and amino acid sequence alignment of PMK and MVD in different species. A: Phylogenetic trees of PMK proteins in different species. B: The phylogenetic tree of MVD protein in different species. The branching number represents confidence, and the scale represents genetic distance. The contents in parentheses represent the gene number of each species.

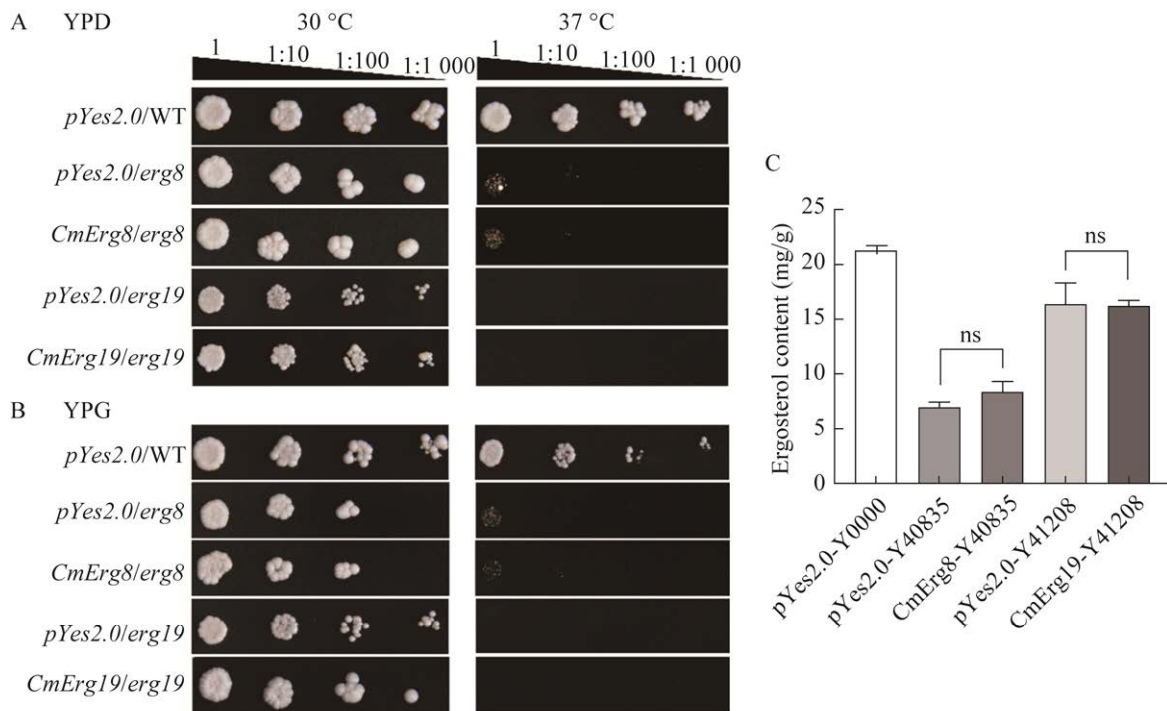


图 2 *CmErg8/erg8* 和 *CmErg19/erg19* 转化子表型及麦角甾醇含量

Figure 2 Phenotypes of *CmErg8/erg8* and *CmErg19/erg19* transformants and ergosterol content. A and B: Growth phenotypes of wild type *Saccharomyces cerevisiae*, *erg8* mutant, *CmErg8/erg8*, *erg19* mutant, and *CmErg19/erg19* on YPD and YPG medium at different temperatures. C: Ergosterol contents of wild type *Saccharomyces cerevisiae*, *erg8* mutant, *CmErg8/erg8*, *erg19* mutant, and *CmErg19/erg19* transformants. Values represent the mean±SD of three independent experiments. ns indicates no significant difference compared with the control.

Erg19 转化子均可在不添加尿昔/尿嘧啶的 CD 培养基生长(图 3A)。通过荧光观察发现,背景菌株 *CmΔpyrG* 营养缺陷型菌株没有荧光,而阳性对照 IF-pEX1 和转化子 IF-*Erg8* 与 IF-*Erg19* 的 GFP 报告基因均表达成功(图 3B);进一步观察分析发现,阳性对照 IF-pEX1 菌株荧光呈现均匀分布,IF-*Erg8*、IF-*Erg19* 转化子荧光不是均匀分布在细胞中,而是呈点状、有区域地分布(图 3C),表明 *CmErg8* 和 *CmErg19* 不定位在细胞质,可能定位于某一特定细胞器中。

2.4 麦角甾醇、虫草素含量

Erg8 和 *Erg19* 均位于麦角甾醇合成通路的上游,研究发现在酵母和米曲霉中过表达 *Erg19* 基因均会降低麦角甾醇含量^[3,25]。然而,关于

Erg8 在真菌中对麦角甾醇含量的影响目前未见报道。在蛹虫草中分别对 *CmErg8* 和 *CmErg19* 进行过表达,每个基因随机选取 3 个转化子,qRT-PCR 检测发现 *CmErg8* 和 *CmErg19* 均成功过表达(图 4A、4B)。而后,对过表达菌株麦角甾醇含量进行测量发现,所选取的 3 株 *CmErg8* 和 *CmErg19* 的过表达菌株中各有 2 株麦角甾醇含量较野生型有显著提高(图 4C)。进一步检测了 *CmErg8* 和 *CmErg19* 过表达蛹虫草的虫草素含量,结果显示, *CmErg8* 过表达菌株有 2 株虫草素含量显著提高;而 *CmErg19* 过表达菌株虫草素含量比对照显著提高 5 倍(图 4D)。因此, *CmErg8* 和 *CmErg19* 不仅参与了蛹虫草麦角甾醇的合成通路,还对虫草素的合成通路有一定影响。

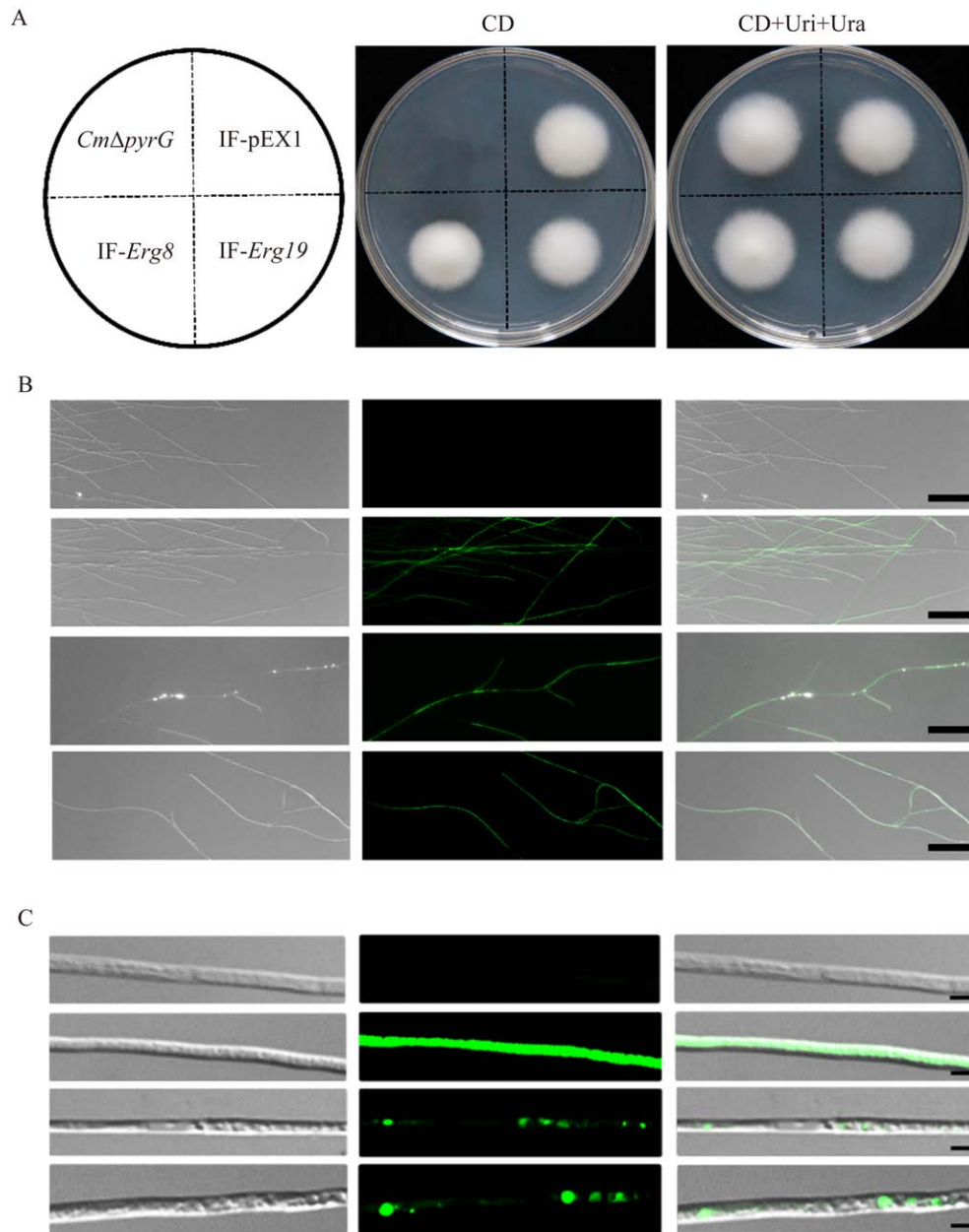


图 3 蛹虫草过表达表型及菌丝 GFP 荧光观察

Figure 3 Overexpressed phenotype of *Cordyceps militaris* and fluorescence observation of GFP in mycelia. A: Uridine/uracil nutrient deficiency background strains (*CmΔpyrG*), unloaded strains (IF-pEX1), and overexpressed strains (IF-*Erg8* and IF-*Erg19*) were cultured on CD and CD+Uri+Ura medium at 22 °C for 6–8 days. B: The fluorescence of *CmΔpyrG*, IF-pEX1, IF-*Erg8*, and IF-*Erg19* strains of *C. militaris* were observed with a 20-fold objective. C: The fluorescence of *CmΔpyrG*, IF-pEX1, IF-*Erg8*, and IF-*Erg19* strains of *C. militaris* were observed with a 63-fold microscope. B and C are bright field, fluorescence, bright field and fluorescence phase superimposed from left to right. The scale in Figure B represents 100 μm and the scale in Figure C represents 5 μm.

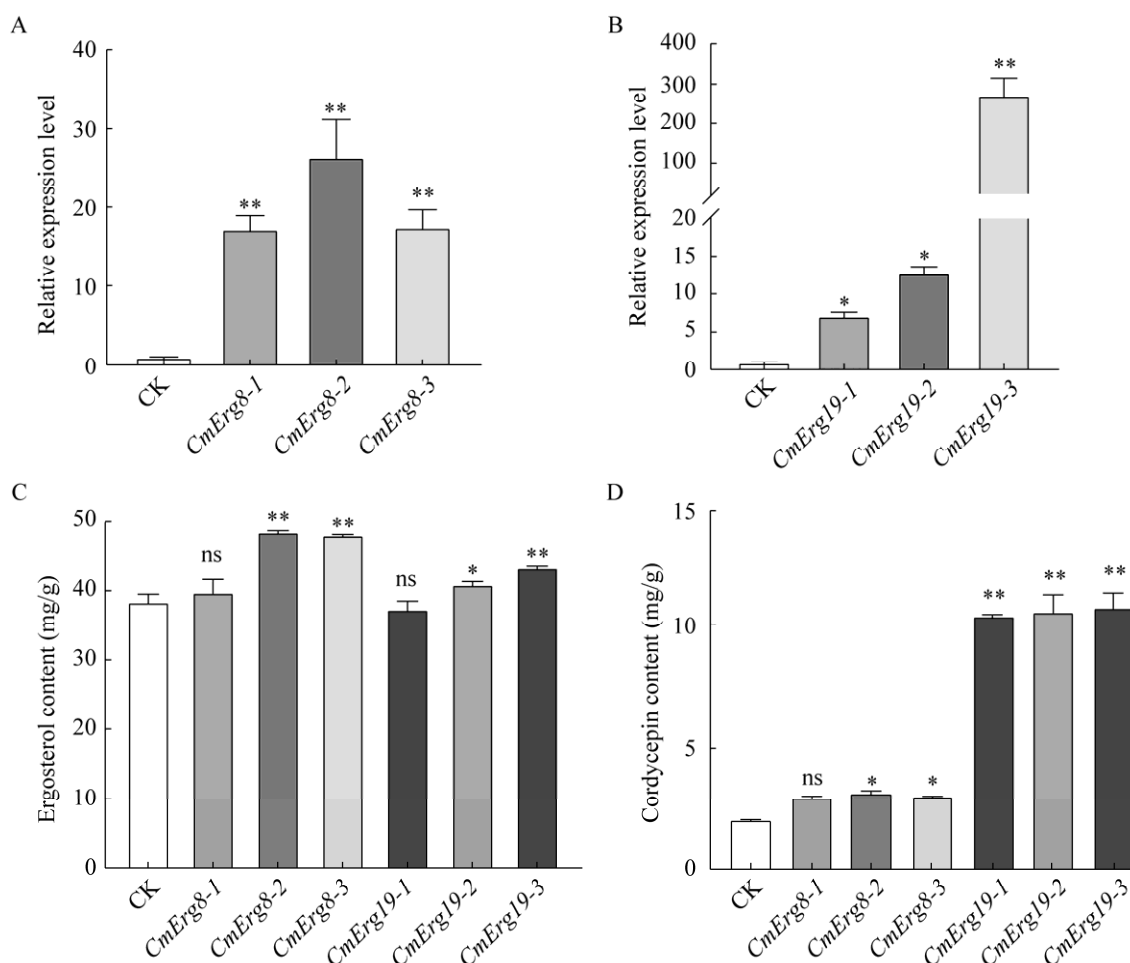


图 4 蛹虫草过表达菌株的表达量、麦角甾醇和虫草素含量

Figure 4 Expression levels, ergosterol, and cordycepin contents of overexpressing strains in *Cordyceps militaris*. A: Analysis of the expression levels of *CmErg8* gene overexpressed in *C. militaris*. B: Analysis of overexpression of *CmErg19* gene in *C. militaris*. C: Ergosterol content of *CmErg8* and *CmErg19* overexpressed in *C. militaris*. D: Cordycepin contents of *CmErg8* and *CmErg19* overexpressed in *C. militaris*. Values represent the mean±SD of three independent experiments. ns indicates no significant difference compared with the control, and the asterisk indicates a significant difference compared to the control ($P<0.05$). Double asterisk indicate a high level of statistical significance compared to the control ($P<0.01$).

3 讨论与结论

在真菌中，MVA 途径是麦角甾醇生物合成途径的上游，但鲜有关于蛹虫草麦角甾醇生物合成途径的研究。蛹虫草 *CmErg8* 和 *CmErg19* 是 MVA 途径上游 2 个连续催化的重要基因，对它们进行研究不仅对理解 MVA 途径具有重要意义，而且对麦角甾醇生物合成途径也具有重要作

用。研究报道麦角甾醇生物合成途径在米曲霉和酵母中较为保守，米曲霉的 *AoErg19* 可以互补酵母 *erg19* 温度敏感表型^[3]。本研究首先通过生物信息学分析对蛹虫草 *CmErg8* 和 *CmErg19* 进行鉴定，利用酵母互补实验发现 *CmErg8* 和 *CmErg19* 均不能恢复对应酿酒酵母突变体温度敏感的致死表型。因此，蛹虫草中 *CmErg8* 和 *CmErg19* 基因的功能比酿酒酵母更为复杂，具

体功能还需要通过进一步的实验进行确认和完善。MVD 和 PMK 在植物、动物和真菌中的不同亚细胞定位可以为不同物种 MVA 途径的遗传修饰提供一些信息。PMK 和 MVD 在不同生物中的亚细胞定位已经被研究,在米曲霉中将 *Aoerg19* 与过氧化物酶体、线粒体和液泡分别共定位,确认 *Aoerg19* 位于液泡中^[3];有报道称 MVD 在人和大鼠细胞中定位于过氧化物酶体^[26],而后又有研究表明,人内源性 MVD 和过表达 MVD 均定位于细胞质^[27];通过原生质体介导转化发现檀香 *SaMK* 和 *SaPMK* 都位于细胞质中^[11]。本研究对蛹虫草过表达菌株 IF-*erg8* 和 IF-*erg19* 的菌丝进行了荧光观察,发现 *CmErg8* 和 *CmErg19* 在蛹虫草中的定位均呈现点状荧光,基因的亚细胞定位需要进一步通过共定位或者免疫荧光技术确定,由于目前还未成功构建不同细胞器定位荧光标记菌株和不同亚细胞定位蛋白抗体,暂时无法确定其具体所定位的细胞器,但根据其荧光形态推测 *CmErg8* 有可能定位于脂滴,而 *CmErg19* 定位与同为真菌的米曲霉 *Aoerg19* 定位于液泡不同,可能定位于脂滴或者过氧化物酶体。

麦角甾醇是一种特殊的细胞膜成分,在真菌生长、繁殖和抗逆性中发挥着重要作用^[7],在丝状真菌中,关于麦角甾醇生物合成的研究主要集中在利用生物合成抑制剂来破坏或抑制真菌中麦角甾醇的合成,从而发现可能具有杀菌和耐药作用的化合物^[28-30]。蛹虫草在临床医学与预防保健中发挥着重要的作用,对蛹虫草麦角甾醇合成途径的研究具有重要意义。在此项研究中,揭示了 *CmErg8* 和 *CmErg19* 的过表达导致麦角甾醇含量显著提高,此结果与 *AoErg19* 在米曲霉中的过表达使其麦角甾醇含量降低不一致,说明蛹虫草与米曲霉这 2 种丝状真菌的 *Erg19* 基因功能存在一定的区别,从而对麦角甾醇含量产生了不

同影响。蛹虫草 2 个过表达菌株麦角甾醇含量提高的幅度都很低,这代表着在蛹虫草中麦角甾醇通路涉及许多酶和步骤,对 *CmErg8* 和 *CmErg19* 过表达时可能导致其他限速酶的积累,从而对麦角甾醇含量产生影响。蛹虫草中被研究最广泛的次级代谢产物之一便是虫草素,本研究测量了 *CmErg8* 和 *CmErg19* 过表达菌株的虫草素含量,发现 *CmErg19* 的过表达对虫草素含量影响较大,表明此基因有可能在虫草素合成过程中有所参与。目前报道虫草素的生物合成始于腺苷,并通过 *CmCns1/Cns2* 复合物催化的磷酸化、去磷酸化和还原的逐步反应得到 3'-脱氧腺苷即虫草素,并且研究发现 *Cns1* 和 *Cns2* 在虫草素合成过程中并不是单一发挥作用,而是形成一个复合体,二者缺一不可^[31]。目前关于虫草素合成的调控机制研究并不是很多,*CmErg19* 是 MVA 途径中重要的酶,对麦角甾醇合成通路中的多种中间代谢产物都有影响,推测可能是这些中间代谢产物参与了调控蛹虫草的虫草素合成,具体机制还有待进一步研究。总之,本研究分析了 *CmErg8* 和 *CmErg19* 的功能、亚细胞定位和对麦角甾醇以及虫草素含量的影响,发现这 2 个基因特别是 *CmErg19* 对虫草素含量有着较大影响。因此,本研究对蛹虫草 *CmErg8* 和 *CmErg19* 的基因功能鉴定可能为蛹虫草 MVA 途径的遗传修饰提供一些有用的信息,并且为蛹虫草的虫草素含量提高提供新途径。

参考文献

- [1] 王宝莲,樊庆琦,李永波,曲志才,楚秀生. 甲羟戊酸激酶基因研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2011, 13(3): 17-25.
WANG BL, FAN QQ, LI YB, QU ZC, CHU XS. Research progress on mevalonate kinase genes[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2011, 13(3): 17-25 (in Chinese).

- [2] CORDIER H, KARST F, BERGES T. Heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding mevalonate diphosphate decarboxylase[J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 39(5): 953-967.
- [3] SUN YL, NIU YL, HUANG H, HE B, MA L, TU YY, TRAN VT, ZENG B, HU ZH. Mevalonate diphosphate decarboxylase MVD/Erg19 is required for ergosterol biosynthesis, growth, sporulation and stress tolerance in *Aspergillus oryzae*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1074.
- [4] 杨恩泽, 陆颖锶, 吴秋红, 王峰. 阳春砂磷酸甲羟戊酸激酶的基因克隆与表达谱分析[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2015, 36(2): 95-101.
- YANG EZ, LU YS, WU QH, WANG F. Cloning and expression profiles analysis of *PMK* gene in *Amomum villosum* Lour[J]. *Journal of Jinan University (Natural Science & Medicine Edition)*, 2015, 36(2): 95-101 (in Chinese).
- [5] KREPKIY D, MIZIORKO HM. Identification of active site residues in mevalonate diphosphate decarboxylase: implications for a family of phosphotransferases[J]. *Protein Science*, 2004, 13(7): 1875-1881.
- [6] HU ZH, LI GH, SUN YL, NIU YL, MA L, HE B, AI MQ, HAN JZ, ZENG B. Gene transcription profiling of *Aspergillus oryzae* 3.042 treated with ergosterol biosynthesis inhibitors[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2019, 50(1): 43-52.
- [7] KODEDOVÁ M, SYCHROVÁ H. Changes in the sterol composition of the plasma membrane affect membrane potential, salt tolerance and the activity of multidrug resistance pumps in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0139306.
- [8] ABBASSI SJ, VISHWAKARMA RK, PATEL P, KUMARI U, KHAN BM. *Bacopa monniera* recombinant mevalonate diphosphate decarboxylase: biochemical characterization[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 79: 661-668.
- [9] 郑汉, 虞慕瑶, 濮春娟, 陈美兰, 李福全, 申业, 黄璐琦. 香樟甲羟戊酸-5-磷酸激酶基因 *CcPMK* 的克隆和表达分析[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(1): 78-84.
- ZHENG H, YU MY, PU CJ, CHEN ML, LI FQ, SHEN Y, HUANG LQ. Cloning and expression analysis of 5-phosphomevalonate kinase gene (*CcPMK*) in *Cinnamomum camphora*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2020, 45(1): 78-84 (in Chinese).
- [10] KIM YK, KIM YB, KIM JK, KIM SU, PARK SU. Molecular cloning and characterization of mevalonic acid (MVA) pathway genes and triterpene accumulation in *Panax ginseng*[J]. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2014, 57(3): 289-295.
- [11] NIU MY, XIONG YP, YAN HF, ZHANG XH, LI Y, TEIXEIRA Da SILVA JA, MA GH. Cloning and expression analysis of mevalonate kinase and phosphomevalonate kinase genes associated with the MVA pathway in *Santalum album*[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 16913.
- [12] 李辉, 温春秀, 刘灵娣, 温赛群, 唐映红, 姜涛. 紫苏甲羟戊酸-5-磷酸激酶基因 *PfPMK* 的克隆与表达分析[J]. 华北农学报, 2022, 37(2): 49-55.
- LI H, WEN CX, LIU LD, WEN SQ, TANG YH, JIANG T. Cloning and expression analysis of 5-phosphomevalonate kinase *PfPMK* gene in *Perilla frutescens* L.[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2022, 37(2): 49-55 (in Chinese).
- [13] DASSANAYAKE R, CAO L, SAMARANAYAKE L, BERGES T. Characterization, heterologous expression and functional analysis of mevalonate diphosphate decarboxylase gene (MVD) of *Candida albicans*[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 267(3): 281-290.
- [14] PHULL AR, AHMED M, PARK HJ. *Cordyceps militaris* as a bio-functional food source: pharmacological potential, anti-inflammatory actions and related molecular mechanisms[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(2): 405.
- [15] GU YX, WANG ZS, LI SX, YUAN QS. Effect of multiple factors on accumulation of nucleosides and bases in *Cordyceps militaris*[J]. *Food Chemistry*, 2007, 102(4): 1304-1309.
- [16] YANG LY, LI GL, CHAI Z, GONG Q, GUO JQ. Synthesis of cordycepin: current scenario and future perspectives[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2020, 143: 103431.
- [17] SEONG DB, HONG S, MUTHUSAMI S, KIM WD, YU JR, PARK WY. Cordycepin increases radiosensitivity in cervical cancer cells by overriding or prolonging radiation-induced G2/M arrest[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2016, 771: 77-83.
- [18] WANG L, YAN HH, ZENG B, HU ZH. Research progress on cordycepin synthesis and methods for enhancement of cordycepin production in *Cordyceps militaris*[J]. *Bioengineering*, 2022, 9(2): 69.
- [19] 张姝, 张永杰, SHRESTHA B, 徐建平, 王成树, 刘杏忠. 冬虫夏草菌和蛹虫草菌的研究现状、问题及展

- 望[J]. 菌物学报, 2013, 32(4): 577-597.
- ZHANG S, ZHANG YJ, SHRESTHA B, XU JP, WANG CS, LIU XZ. *Ophiocordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*: research advances, issues and perspectives[J]. *Mycosystema*, 2013, 32(4): 577-597 (in Chinese).
- [20] KIM HO, YUN JW. A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99(4): 728-738.
- [21] 王立, 黄慧, 刘新平, 王兴明, 曾斌, 胡志宏. 农杆菌介导的蛹虫草营养缺陷型菌株和遗传转化体系的构建[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3373-3386.
- WANG L, HUANG H, LIU XP, WANG XM, ZENG B, HU ZH. Construction of *Agrobacterium*-mediated auxotrophic strain and genetic transformation system of *Cordyceps militaris*[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(8): 3373-3386 (in Chinese).
- [22] JIN Q, LI GH, QIN KH, SHANG YT, YAN HH, LIU HL, ZENG B, HU ZH. The expression pattern, subcellular localization and function of three sterol 14 α -demethylases in *Aspergillus oryzae*[J]. *Frontiers in Genetics*, 2023, 14: 1009746.
- [23] HUANG H, NIU YL, JIN Q, QIN KH, WANG L, SHANG YT, ZENG B, HU ZH. Identification of six thiolases and their effects on fatty acid and ergosterol biosynthesis in *Aspergillus oryzae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(6): e02372-21.
- [24] NGUYEN KT, HO QN, PHAM TH, PHAN TN, TRAN VT. The construction and use of versatile binary vectors carrying *pyrG* auxotrophic marker and fluorescent reporter genes for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus oryzae*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 32(12): 1-9.
- [25] BERGÈS T, GUYONNET D, KARST F. The *Saccharomyces cerevisiae* mevalonate diphosphate decarboxylase is essential for viability, and a single Leu-to-Pro mutation in a conserved sequence leads to thermosensitivity[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(15): 4664-4670.
- [26] KOVACS WJ, OLIVIER LM, KRISANS SK. Central role of peroxisomes in isoprenoid biosynthesis[J]. *Progress in Lipid Research*, 2002, 41(5): 369-391.
- [27] HOGENBOOM S, TUYP JJM, ESPEEL M, KOSTER J, WANDERS RJA, WATERHAM HR. Human mevalonate pyrophosphate decarboxylase is localized in the cytosol[J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2004, 81(3): 216-224.
- [28] ALCAZAR-FUOLI L, MELLADO E. Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 3: 439.
- [29] DHINGRA S, CRAMER RA. Regulation of sterol biosynthesis in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: opportunities for therapeutic development[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 92.
- [30] KOSELYNY K, MUTLU N, MINARD AY, KUMAR A, KRYSAN DJ, WELLINGTON M. A genome-wide screen of deletion mutants in the filamentous *Saccharomyces cerevisiae* background identifies ergosterol as a direct trigger of macrophage pyroptosis[J]. *mBio*, 2018, 9(4): e01204-e1218.
- [31] XIA YL, LUO FF, SHANG YF, CHEN PL, LU YZ, WANG CS. Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin[J]. *Cell Chemical Biology*, 2017, 24(12): 1479-1489.e4.