

丝状真菌启动子研究进展

林涛, 黄建忠* (福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心生命科学学院, 福建省现代发酵技术工程研究中心, 福建福州 350108)

摘要 文中综述了丝状真菌中用于开启异源或同源基因表达的启动子的最新进展。分别重点介绍了在丝状真菌中诱导型启动子、组成型启动子及其他一些启动子的应用情况, 为在丝状真菌中表达异源基因或一些新基因功能的研究提供帮助。

关键词 丝状真菌; 启动子

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)07-02862-02

Research Advance on Promoters for Heterologous Gene Expression in Filamentous Fungi

LIN Tao et al (Engineering Research Center of Fujian Modern Fermentation Technology, College of Life Science, Engineering Research Center of Industrial Microbiology of Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108)

Abstract The latest progress of promoter for heterologous or homologous gene expression used in filamentous fungi was reviewed. The application of inducible and constitutive promoter in the filamentous fungi was introduced respectively, which provides help for the expression of heterologous gene or the research of some novel genes in the filamentous fungi.

Key words Filamentous fungi; Promoter

丝状真菌(Filamentous Fungi)是真菌界子囊菌门的一个亚门。一些工业上重要酶类的生产菌如里氏木霉、黑曲霉, 还有用于生产青霉素的黄青霉, 都属于丝状真菌。许多的生物产品和商业酶制剂都是用丝状真菌作为宿主生产的。其中木霉属和黑曲霉属由于能高效表达外源蛋白, 因此在丝状真菌中常被用于表达感兴趣的目的基因。此外, 一些在遗传上易于操作的模式菌, 如粗糙链孢霉和构巢曲霉通常被用来研究真菌的基础生物特性。丝状真菌在表达内源基因时的量常常大的惊人, 这暗示着这些内源基因可能由强大的启动子来驱动表达。但与内源蛋白相比, 丝状真菌通常在表达异源蛋白时的量并不是很高^[1]。所以, 为获取异源基因的高效表达, 需要强大的启动子来驱动基因的转录。

启动子(Promoter)是位于结构基因上游供RNA聚合酶特异性识别和结合的一段5'-非编码区的DNA序列。RNA聚合酶一旦识别并结合到启动子上就可开启基因的转录。丝状真菌的启动子按功能可分为2类: 诱导型启动子和组成型启动子。文中综述了在丝状真菌中用于表达异源基因常用启动子的研究情况, 分别着重介绍了在不同宿主中表达不同异源基因所运用到的诱导型启动子和组成型启动子。

1 丝状真菌中用于表达异源基因的诱导型启动子

诱导型启动子是在某些诱导物存在的条件下, 可大幅度提高基因转录水平的序列, 这些诱导型的基因通常是受到严格调控的, 只有在受到诱导的情况下, 才由启动子驱动基因表达。例如: 在里氏木霉中, 大多数的纤维素酶是诱导酶, 这些基因的启动子在有诱导物存在的情况下才能开启基因的转录。目前在丝状真菌中主要是运用诱导型强启动子表达异源基因。

1.1 里氏木霉 *cbh1* 启动子的应用 里氏木霉是重要的纤维素酶和半纤维素酶的工业生产菌株。纤维素酶在生物燃

料的生产上扮演了十分重要的角色。因此, 在里氏木霉中, 与纤维素酶和半纤维素酶相关的启动子也引起了研究者的注意。在控制发酵条件下, 里氏木霉最高的纤维素酶产量可达100 g/L^[2], 其中纤维二糖水解酶I(CBH1)占有外分泌蛋白的50%~60%。CBH1的表达受纤维素、乳糖、纤维二糖、槐二糖等诱导物的诱导, 而在葡萄糖存在的条件下, 由于存在碳源代谢阻遏, 所有纤维素酶、半纤维素酶的表达受阻遏。从另一方面来说, 里氏木霉高纤维素酶的表达量是受到严格调控的。目前已发现这个调控过程的3个正调控因子(XYR1、ACE2、HAP2/3/5)和2个负调控因子(ACE1、CRE1)。在里氏木霉中大部分的异源基因都用*cbh1*启动子驱动表达。有趣的是, 里氏木霉的*cbh1*启动子也可成功地在木霉属的其他种里驱动基因转录。例如: 在哈茨木霉中, *cbh1*启动子可驱动内源内切几丁质酶的转录, 并使该酶的活性提高5倍^[3]。运用*cbh1*启动子已成功表达过的蛋白包括: 牛凝乳蛋白酶、射脉菌漆酶、葡萄糖淀粉酶、哈茨木霉内切几丁质酶、嗜热网球菌木聚糖酶、人类白细胞介素-6、Fab抗体片段、大麦内肽酶B、黑曲霉脂肪酶、黑曲霉酸性磷酸酶。

1.2 曲霉属的 *glaA* 启动子 曲霉属的 α -葡萄糖淀粉酶(GlaA)是一种能将淀粉分解为葡萄糖的酶。与CBH1相似, GlaA的分泌量也很大, 在黑曲霉中, α -葡萄糖淀粉酶的产量可达20 g/L^[4]。因此, 在曲霉属的几个种: 构巢曲霉、黑曲霉、米曲霉、泡盛曲霉中, 最常见到*glaA*启动子。和里氏木霉的*cbh1*启动子类似, 曲霉属的不同种之间也可利用*glaA*启动子表达异源基因。如: 利用黑曲霉的*glaA*启动子在构巢曲霉中成功表达了牛凝乳蛋白酶^[5]。此外, 运用*glaA*启动子已成功表达过的蛋白有: 人源乳铁蛋白和人类白细胞介素-6。

1.3 构巢曲霉 *alcA* 启动子 构巢曲霉的*alcA*启动子是被乙醇高度诱导而被葡萄糖阻遏的启动子。已在构巢曲霉中运用*alcA*成功表达异源基因的蛋白包括: 红色荧光蛋白、绿色荧光蛋白、人源乳铁蛋白、人类干扰素 $\alpha 2$ 和粪肥纤维单胞菌内切葡聚糖酶。有报道, 一株去葡萄糖阻遏的突变株已被用于生产人类白细胞介素-6^[6]。

作者简介 林涛(1989-), 男, 福建仙游人, 硕士研究生, 研究方向: 工业微生物, E-mail: 466034414@qq.com。* 通讯作者, 教授, 博士, 从事微生物功能基因和工业酶制剂的研发工作, E-mail: hjz@fjnu.edu.cn。

收稿日期 2013-03-08

2 丝状真菌中用于表达异源基因组成型启动子

组成型启动子是一类控制结构基因转录量恒定在一定水平的 DNA 序列,在此类启动子的控制下,基因持续稳定地表达,并不受时空调控和诱导因子的影响。在丝状真菌中,运用组成型启动子表达异源基因具有十分重要的作用。

2.1 *gpdA* 启动子 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GPDA)是催化糖酵解途径第 6 步的酶。该酶的基因 *gpdA* 在构巢曲霉中是组成型表达的^[7],并且可驱动异源基因的转录。有研究报道,在黑曲霉中运用 *gpdA* 启动子表达的大肠杆菌 β-半乳糖苷酶和 β-葡萄糖醛酸酶占有可溶蛋白的 10% ~ 25%^[8]。*gpdA* 作为一种组成型启动子,其特点是持续表达相对稳定的蛋白量,不受外界诱导因素的影响。有研究从 NaCl 依赖培养中分离到的一株构巢曲霉 *pda* 启动子突变株,发现其在逐渐增加 NaCl 浓度的培养下表达了大量的 β-葡萄糖醛酸酶^[9]。这暗示着,在非诱导情况下,*pda* 启动子可用于异源基因更高水平的表达。

2.2 木霉属 *pki1* 启动子 里氏木霉 *pki1* 是编码丙酮酸激酶组成型表达的基因。*pki1* 启动子常用于表达一些筛选标记基因,如大肠杆菌的 *php* 基因^[10],还有一些报告基因,如哈茨木霉的 GFP 蛋白^[11]。目前 *pki1* 启动子只被运用于一些胞内表达的异源蛋白,胞外表达很少有报道。

表 1 丝状真菌中用于表达异源基因的诱导型和组成型启动子

菌名	启动子	异源基因	产量 mg/L	参考文献
里氏木霉	<i>cbh1</i>	牛凝乳蛋白酶	40	Harkki 等 ^[13]
里氏木霉	<i>cbh1</i>	射脉菌漆酶	20	M. Saloheimo 等 ^[14]
里氏木霉	<i>cbh1</i>	葡萄糖淀粉酶	700	Joutsjoki 等 ^[15]
里氏木霉	<i>cbh1</i>	Fab 抗体片段	150	Keranen 等 ^[16]
里氏木霉	<i>cbh1</i>	哈茨木霉内切几丁质酶	130	Margolles-Clark 等 ^[3]
里氏木霉	<i>cbh1</i>	大麦内肽酶 B	500	Saarelainen 等 ^[17]
里氏木霉	<i>cbh1</i>	黑曲霉脂肪酶	310	Qin 等 ^[18]
构巢曲霉	<i>glaA</i>	牛凝乳蛋白酶	146 μg/每 1 g 菌丝干重	Cullen 等 ^[5]
构巢曲霉	<i>glaA</i>	人类白细胞介素-6	0.025	Carrez 等 ^[19]
黑曲霉	<i>glaA</i>	黄孢平革菌锰过氧化物酶	100	Punt 等 ^[20]
黑曲霉	<i>glaA</i>	人体组织纤溶酶原激活蛋白	25	Wiebe 等 ^[21]
构巢曲霉	<i>alcA</i>	人源乳铁蛋白	5	Ward 等 ^[22]
构巢曲霉	<i>alcA</i>	人类干扰素 α2	1	Gwynne 等 ^[23]
构巢曲霉	<i>alcA</i>	粪肥杆菌内切葡聚糖酶	20	Gwynne 等 ^[23]
黑曲霉	<i>alcA</i>	人类白细胞介素-6	100 ~ 500	Hintz 等 ^[6]
黑曲霉	<i>gpdA</i>	黄孢平革菌锰过氧化物酶	15 ~ 25	Punt 等 ^[20]
黑曲霉	<i>gpdA</i>	人体组织纤溶酶原激活蛋白	12	Wiebe 等 ^[21]

3 其他在丝状真菌中用于表达异源基因的启动子

在丝状真菌中,除占大多数的诱导型启动子和组成型启动子外,还有一些其他来源的启动子也被用于外源基因的表达。里氏木霉的 *cDNA1* 启动子和 *tefl* 启动子能够在葡萄糖作为唯一碳源的情况下,驱动纤维素和半纤维素酶的表达,而在此条件下,大部分的纤维素酶和半纤维素酶都受到葡萄糖阻遏,这样就有助于表达的异源纤维素酶的纯化。笔者利用 *cDNA1* 启动子成功地在里氏木霉 C30 中表达了糙皮侧耳 *Pleurotus ostreatus* 漆酶,在葡萄糖培养下于 54 h 时达最高酶活 7.4 U/ml。此外,有研究报道了米曲霉中 *melO*(编码酪氨

酸酶的基因)启动子在表达异源基因方面的前景^[12]。

4 展望

在丝状真菌中,启动子在表达异源基因上起很大作用,此外,不同类型的启动子在表达蛋白时发挥的作用也不同(表 1)。笔者综述了丝状真菌中已发表的用于表达异源基因的诱导型和组成型启动子,为将来大量表达异源基因提供了启动子方面的数据,此外,对研究新的结构基因也有所帮助。

参考文献

[1] GOUKA R,PUNT P,VAN DEN HONDEL C. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*,1997,47(1):1-11.

[2] CHERRY J R,FIDANTSEF A L. Directed evolution of industrial enzymes: an update[J]. *Curr Opin Biotechnol*,2003,14(4):438-443.

[3] MARGOLLES-CLARK E,HARMAN G E,PENTTILA M. Enhanced Expression of Endochitinase in *Trichoderma harzianum* with the *cbh1* Promoter of *Trichoderma reesei* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996,62(6):2152-2155.

[4] VAN BRUNT J. Fungi: the perfect hosts? [J]. *Bio Technology*, 1986,4(12):1057-1058,1060-1062.

[5] CULLEN D,GRAY G L,WILSON L J,et al. Controlled expression and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus nidulans* [J]. *Bio/Technology*, 1987,5(4):369-376.

[6] HINTZ W E,KALSNER I,PLAWINSKI E,et al. Improved gene expression in *Aspergillus nidulans* [J]. *Canadian Journal of Botany*,1995,73(S1):876-884.

[7] PUNT P J,DINGEMANSE M A,KUYVENHOVEN A,et al. Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [J]. *Gene*,1990,93(1):101-109.

[8] PUNT P J,ZEGERS N D,BUSSCHER M,et al. Intracellular and extracellular production of proteins in *Aspergillus* under the control of expression signals of the highly expressed *Aspergillus nidulans gpdA* gene[J]. *Journal of Biotechnology*,1991,17(1):19-33.

[9] REDKAR R J,HERZOG R W,SINGH N K. Transcriptional activation of the *Aspergillus nidulans gpdA* promoter by osmotic signals[J]. *Applied and Environmental Microbiology*,1998,64(6):2229-2231.

[10] MACH R L,SCHINDLER M,KUBICEK C P. Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals[J]. *Current Genetics*,1994,25(6):567-570.

[11] ZOHAR-PEREZ C,CHET I,NUSSINOVITCH A. Unexpected distribution of immobilized microorganisms within alginate beads[J]. *Biotechnology and Bioengineering*,2004,88(5):671-674.

[12] ISHIDA H,MATSUMURA K,HATA Y,et al. Establishment of a hyper-protein production system in submerged *Aspergillus oryzae* culture under tyrosinase-encoding gene(*melO*) promoter control[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*,2001,57(1):131-137.

[13] HARKKI A,UUSITALO J,BAILEY M,et al. A novel fungal expression system: secretion of active calf chymosin from the filamentous fungus *Trichoderma reesei* [J]. *Nature Biotechnology*,1989,7(6):596-603.

[14] SALOHEIMO M,BARAJAS V,NIKU-PAAVOLA M L,et al. A lignin peroxidase - encoding cDNA from the white - rot fungus *Phlebia radiata*: characterization and expression in *Trichoderma reesei* [J]. *Gene*,1989,85(2):343-351.

[15] JOUTSJOKI V V,TORKKELI T K,HELENA NEVALAINEN K. Transformation of *Trichoderma reesei* with the *Hormoconia resiniae glucoamylase P (gamP)* gene: production of a heterologous glucoamylase by *Trichoderma reesei* [J]. *Current Genetics*,1993,24(3):223-228.

[16] KER NEN S,PENTTIL M. Production of recombinant proteins in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* [J]. *Current Opinion in Biotechnology*,1995,6(5):534-537.

[17] SAARELAINEN R,MANTYLA A,NEVALAINEN H,et al. Expression of Barley Endopeptidase B in *Trichoderma reesei* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*,1997,63(12):4938-4940.

[18] QIN L N,CAI F R,DONG X R,et al. Improved production of heterologous lipase in *Trichoderma reesei* by RNAi mediated gene silencing of an endogenic highly expressed gene [J]. *Bioresource Technology*,2012,109:116-122,

用^[6],它们可以帮助打开或关闭基因。成千上万的蛋白着陆点都会影响基因的活性,DNA 伸张的长度不同会使其转录成不同的 RNA,并且,很多着陆点都是化学构象导致染色体伸张沉默的地方,使基因组的 80% 都具有生化活性^[7]。ENCODE 的所有发现都能为进一步研究基因的调控提供重要参考。

目前,通过基因工程预防和治疗疾病越来越受重视,已有研究者通过研究每个基因突变后对人体产生的影响,发现并不是只有外显子才对疾病有影响,一些非编码序列同样对疾病有一定的影响。了解这些后,在对一些疾病的遗传风险因子进行识别时,或许可更准确地找出影响疾病的基因,而不仅局限于编码序列,从而找出可根治一些疑难杂症的方法。

当今社会由于环境恶化、生活方式不规律等问题导致癌症的发病率越来越高,每年因为癌症而死亡的人数也越来越多,因此如何有效治疗癌症及预防癌症已变成了迫在眉睫的问题。如果能明确癌症的致病机理,就可找出相应的 DNA 疫苗,从而教会人体免疫系统如何杀死肿瘤,到那时治疗癌症就像治疗普通感冒一样简单。不仅是癌症,研究者也希望可通过基因治疗的手段来治愈其他疾病。

如今,转基因食品在人们餐桌上出现的频率越来越高,人类对动植物基因的改造也越来越普遍,如果能通过 ENCODE 项目知道人类每个基因所包含的信息,以及信息的表达方式,研究者可能就可用与对动植物一样的方式对人类的基因进行改造,通过对可能致病的基因进行修饰,从而减少一些疾病的发病率。甚至或许有一天,人们可通过对未出生的孩子进行基因修饰,使人类的后代免于疾病的困扰,赋予他们想要得到的一切特性。

3 展望

目前,ENCODE 项目的重要成果引起了人们的广泛关注。《纽约时报》提到 ENCODE 的发现是极其重要的资源,是医学科学的重大突破,它将会为人类健康做出直观的、重大的贡献。《卫报》则指出:ENCODE 是继人类基因组之后,人们深入了解 DNA 的重要里程碑^[8]。但仍有一些科学家质

疑 ENCODE 的研究结果。他们认为:很大一部分 RNA 作为假基因产物,不形成蛋白质,这是很早就知道的事实,不是什么新发现。

ENCODE 项目还面临着许多挑战。基因转录存在许多差异,基因调控是动态的过程,人们并不知道那些被称为转录因子的蛋白质与基因组结合发挥多大的功能,这使得 ENCODE 加入大量不同的试验来认识各种类的细胞是如何转录的,并且捕捉动态的基因调控也将成为未来的主要挑战之一。目前,ENCODE 进一步的挑战是确定基因组分是如何形成特殊的基因网络,并如何以此来指导生物的生化途径,实现复杂功能的(如细胞与细胞之间的信号传递)^[9]。

总的来说,ENCODE 新发现的那些或多或少与疾病相关特异 DNA 相重合的功能区域表明基因修饰、基因调控都与疾病的防治有重要关系。科学家已研究了与多种疾病相关的细胞和基因。现今,科学家能够用试验解释疾病与基因间相互关系的分子机制,如果找到了转录因子的关键点,掌握了人类基因组包含的所有信息,确定疾病与基因的关系,就能发明潜在的疗法,为人类健康做出重要贡献,使 ENCODE 真正的名副其实。

参考文献

- [1] Science, BREAKTHROUGH OF THE YEAR; The Runners – Up [N]. Science, 2012 – 12 – 21.
- [2] KOLATA G. Bits of Mystery DNA, Far From Junk, ‘Play Crucial Role’ [N]. The New York Times, 2012 – 09 – 05.
- [3] ENCODE Project Consortium. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project [J]. Nature, 2007, 447 (7146): 799 – 816.
- [4] WEINSTOCK G M. ENCODE: More genomic empowerment [J]. Genome Research, 2007, 17 (6): 667 – 668.
- [5] PENNISI E. ENCODE Project Writes Eulogy for Junk DNA [J]. Science, 2012, 337: 1159 – 1161.
- [6] MAURANO M T. Systematic localization of common disease associated variation in regulatory DNA [J]. Science, 2012, 337 (6099): 1190 – 1195.
- [7] BLACKMORE W A. Expression control [J]. Nature, 2012, 489: 53 – 54.
- [8] JHA A. Breakthrough Study Overtums Theory of ‘Junk DNA’ in Genome [N]. The Guardian, 2012 – 09 – 05.
- [9] ECKER J R. Serving up a genome feast [J]. Nature, 2012, 489 (7414): 52 – 55.
- [10] PRITCHARD J K. Evolution and the code [J]. Nature, 2012, 489: 55.
- [11] Science, BREAKTHROUGH OF THE YEAR; The Runners – Up [N]. Science, 2012 – 12 – 21.
- [12] KOLATA G. Bits of Mystery DNA, Far From Junk, ‘Play Crucial Role’ [N]. The New York Times, 2012 – 09 – 05.
- [13] ENCODE Project Consortium. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project [J]. Nature, 2007, 447 (7146): 799 – 816.
- [14] WEINSTOCK G M. ENCODE: More genomic empowerment [J]. Genome Research, 2007, 17 (6): 667 – 668.
- [15] PENNISI E. ENCODE Project Writes Eulogy for Junk DNA [J]. Science, 2012, 337: 1159 – 1161.
- [16] MAURANO M T. Systematic localization of common disease associated variation in regulatory DNA [J]. Science, 2012, 337 (6099): 1190 – 1195.
- [17] BLACKMORE W A. Expression control [J]. Nature, 2012, 489: 53 – 54.
- [18] JHA A. Breakthrough Study Overtums Theory of ‘Junk DNA’ in Genome [N]. The Guardian, 2012 – 09 – 05.
- [19] ECKER J R. Serving up a genome feast [J]. Nature, 2012, 489 (7414): 52 – 55.
- [20] PRITCHARD J K. Evolution and the code [J]. Nature, 2012, 489: 55.
- [19] CARREZ D, JANSSENS W, DEGRAVE P, et al. Heterologous gene expression by filamentous fungi: secretion of human interleukin-6 by *Aspergillus nidulans* [J]. Gene, 1990, 94 (2): 147 – 154.
- [20] PUNT P J, VAN BIEZEN N, CONESA A, et al. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production [J]. Trends in Biotechnology, 2002, 20 (5): 200 – 206.
- [21] WIEBE M G, KARANDIKAR A, ROBSON G D, et al. Production of tissue plasminogen activator (t-PA) in *Aspergillus niger* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2001, 76 (2): 164 – 174.
- [22] WARD P P, MAY G S, HEADON D R, et al. An inducible expression system for the production of human lactoferrin in *Aspergillus nidulans* [J]. Gene, 1992, 122 (1): 219 – 223.
- [23] GWYNNE D I, BUXTON F P, WILLIAMS S, et al. Genetically engineered secretion of active human interferon and a bacterial endoglucanase from *Aspergillus nidulans* [J]. Nature Biotechnology, 1987, 5 (7): 713 – 719.
- [24] 李锐, 贺亮, 吴勤勤. 丝状真菌蛋白质组分析方法的建立 [J]. 华北农学报, 2012 (S1): 93 – 96.
- [25] 李爽, 孟凡欢, 刘丹, 等. 产纤维素酶渤海丝状真菌 ZDTJ097 – 1 – (7) 的筛选及产酶研究 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40 (7): 3853 – 3855, 3862.

(上接第 2863 页)