

## 丝状真菌启动子的基因工程改造进展\*

# Research Progress Towards Promoters Genetic Engineering in Filamentous Fungi

孙先花, 苏小运\*\*

SUN Xianhua, SU Xiaoyun

(中国农业科学院饲料研究所农业部饲料生物技术重点开放实验室, 北京 100081)

(Institute of Feed Research of CAAS, Beijing, 100081, China)

**摘要:**丝状真菌是重要的工业酶生产菌,具有优异的蛋白表达和分泌能力,如里氏木霉在工业发酵中其内源纤维素酶产量可高达 100 g/L。目前,丝状真菌已被成功用于表达外源基因,但与内源基因相比,外源基因的表达效率常常不高。使用强启动子来驱动基因转录可有效提高外源基因的表达水平,因此本文就通过基因工程的方法对丝状真菌的启动子进行改造以提高内、外源基因的转录效率的研究进行总结与展望。

**关键词:**丝状真菌 启动子 基因工程

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2017)01-0073-04

**Abstract:**Filamentous fungi are important industrial microbes with excellent ability of protein expression and secretion. For example, *Trichoderma reesei* can produce its endogenous cellulase with a titer of up to 100 g/L in industrial fermentation conditions. Currently, filamentous fungi have been successfully used to express heterologous genes. However, compared with endogenous gene expression, the expression of heterologous genes in filamentous fungi is often of low efficiency. In order to increase the expression level of heterologous genes, one effective way is to use strong promoters to drive gene transcription. In this paper, we discuss the progress of genetic modification of the filamentous fungi promoters to improve transcription efficiency of endogenous and heterologous genes.

**Key words:** filamentous fungi, promoter, genetic engineering

## 0 引言

丝状真菌在工业生产过程中常用于酶、有机酸和抗生素等的生产,在生产商业酶制剂领域处于核心地

位<sup>[1]</sup>,一些重要的工业酶生产菌株如黑曲霉、米曲霉和里氏木霉都属于丝状真菌。丝状真菌具有表达量高、分泌效率高等特点,如里氏木霉在工业发酵中内源纤维素酶产量可高达 100 g/L<sup>[2]</sup>;同时,丝状真菌还能进行各种翻译后加工,如糖基化、蛋白酶的切割和二硫键的形成等修饰<sup>[3]</sup>。有的丝状真菌在表达某些基因时产量很高,如里氏木霉纤维二糖水解酶 I (CBH1)占胞外分泌蛋白的 50%左右<sup>[4]</sup>,意味着这些基因的启动子能高效地驱动基因的转录和表达<sup>[5]</sup>。然而丝状真菌在表达外源基因时,往往表达量较低。因此,采用基因工程的方法对启动子进一步改造获得转录效率更强的启动子,有可能提高外源基因的表达量<sup>[6]</sup>。

收稿日期:2017-01-15

修回日期:2017-02-18

作者简介:孙先花(1992—),女,硕士,主要从事真菌基因工程研究。

\*国家自然科学基金青年基金项目“多基因协同调控里氏木霉高效分泌表达蛋白的研究”(项目批准号:31400067)资助。

\*\*通信作者:苏小运(1979—),男,博士,研究员,主要从事木质纤维素降解和利用研究,E-mail:suxiaoyun@caas.cn。

启动子通常位于结构基因上游,作为基因的 5' 非编码 DNA 序列,转录因子能和其上特定基序(motif)进行特异识别、结合,进而招募 RNA 聚合酶启动基因的转录。按其驱动基因的表达形式,启动子分为两类:组成型启动子和诱导型启动子。根据不同的宿主菌和不同的目的基因,需选择不同类型的启动子指导目的基因的表达。在丝状真菌中高效表达外源基因,通常选择宿主细胞自身的强启动子进行转录,使用较多的如里氏木霉纤维二糖水解酶 I 基因(*cbh1*)启动子、曲霉糖化酶基因(*glaA*)启动子和 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(*gpdA*)<sup>[7]</sup>启动子等。由于丝状真菌表达外源基因常常效率较低,对这类组成型或诱导型强启动子均有必要进行改造来提高外源基因的表达量。已有文献报道采用基因工程法改造启动子的确能提高下游基因的表达<sup>[8]</sup>。

基因工程法改造启动子的方式多样,主要包括定点突变、区段操作、易错 PCR、DNA shuffling 和核苷酸类似物突变等。定点突变法是根据启动子上结合基序特征和已知的调控机理,对启动子特定序列进行突变改造,所得到的突变体数量少、工作量较小;区段操作是在熟知启动子上转录因子结合基序的前提下,对启动子区段进行删除、替换、多拷贝的顺式作用原件插入,主要也是改变启动子中受转录因子影响的位点。其余 3 种方法则是通过突变构建一个启动子突变体库,通过报告基因的表达从库里筛选转录活性提高的启动子,一般工作量大于定点突变法。常使用的报告基因包括常  $\beta$ -半乳糖苷酶基因(*lacZ*)、绿色荧光蛋白基因(*GFP*)<sup>[9]</sup>、红色荧光蛋白基因(*DsRed*)和葡萄糖醛酸酶基因(*GUS*)<sup>[10]</sup>等。以下介绍几种基因工程改造启动子的方法。

## 1 定点突变

定点突变在启动子改造中是常用的方法。常见的一种定点突变方法是通过启动子上的转录抑制因子结合位点进行突变,破坏这类位点,从而提高启动子的转录效率。采用此类方法,必须对启动子关键转录因子的结合位点有深入了解。里氏木霉中,*cbh1*启动子作为诱导型的启动子,受到葡萄糖碳源的抑制作用。在*cbh1*启动子的-700 bp 到-1000 bp 区域存在和葡萄糖抑制相关的广域调节的转录抑制因子 *Crel* 的结合位点<sup>[11]</sup>。唐僊洋等<sup>[6]</sup>采用定点突变法对里氏木霉 *cbh1* 启动子进行改造,通过对 4 个 *Crel* 结合位点(5'-SYGGRG-3')依次进行定点突变,以红色荧光蛋白作为报告基因,发现 4 次突变对启动子强度都有一定的提高:第一处突变对启动子活性影响最为

显著,几乎提高整个启动子 21.19% 的表达能力,而其余 3 处突变对启动子的活性也有一定提高。Zou 等<sup>[12]</sup>则将 *cbh1* 启动子-690、-698、-724<sup>[13]</sup> 3 处 *Crel* 结合位点分别突变成 *Hap2*、*Hap2* 和 *Ace2* 等转录激活因子的结合位点,绿色荧光蛋白在改造后的启动子驱动下,在诱导培养基中的表达量提高 5.5 倍;将改造的启动子用于驱动 *cbh1* 和 *eg11* 的表达,酶活力有很大提高。定点突变法能快速有效的得到优良的启动子,但是有时进行一个或少数几个位点的单点或组合突变并不能对启动子性能有所提升,还需要进行多次突变评估。

## 2 区段操作

早在 1994 年,Verdoes 等<sup>[14]</sup>就在黑曲霉中引入多个拷贝的 *glaA* 启动子试图提高  $\beta$ -葡糖醛酸酶编码基因(*uidA*)的表达。虽然在此研究中,*uidA* 表达量有所降低,未达到预期增强表达的效果,但这为使用区段法改造启动子开创了道路并具有一定的借鉴意义<sup>[14]</sup>。同定点突变法类似,对启动子区段进行删除、替换、多拷贝的顺式作用原件插入,主要也是改变启动子中受转录因子影响的位点。通常,采用引入转录激活因子<sup>[15]</sup>的结合位点或者删除抑制因子<sup>[16]</sup>的结合位点来达到提高下游基因转录水平。Minetoki 等<sup>[17]</sup>采用插入多拷贝顺式作用元件的方式对米曲霉 *agdA* 启动子进行改造:米曲霉 *agdA* 启动子含有 3 个高度保守的序列,称为区段 I、II 和 III,区段 III 能显著增加报告基因的表达,增加 *agdA* 启动子中 III 区的拷贝数,外源基因的转录活性得到明显提高。Liu 等<sup>[18]</sup>在黑曲霉 *glaA* 启动子的顺式调节区段引入多拷贝的转录激活蛋白的结合基序 CCAAT,将该改造后的启动子插入到表达质粒中大大增强外源蛋白质的表达,表明引入含 CCAAT 的序列增加启动子活性,可改善曲霉中异源和内源基因的表达。另外,还对里氏木霉 *cbh1* 启动子的区段采取删除及多拷贝的顺式作用原件插入相结合的方式改造。据了解,*cbh1* 启动子的-1301 到-869 及-677 到-724 两处区段含有 4 个潜在的葡萄糖阻遏位点<sup>[12,19]</sup>。Liu 等<sup>[20-21]</sup>采用重组 PCR 法删除这两处区段,并将此启动子构建成以 *gus* 基因作为报告基因的质粒  $\Delta pC$ 。由于  $\Delta pC$  *cbh1* 启动子的-820 到-620 区段含有 CCAAT 盒(*Hap2* 的结合位点)及 *Ace2* 等转录激活因子的结合位点,作者又构建分别含该功能区 2, 4, 6 拷贝序列的质粒  $\Delta p2C$ 、 $\Delta p4C$  和  $\Delta p6C$ ,然后将这些质粒分别转化里氏木霉,并进行 GUS 比活测定,结果显示改造后的启动子解除了葡萄糖阻遏效应,且

$\Delta pC$  启动子是全长 *cbh1* 启动子强度的 1.8 倍。在此基础上的多拷贝启动子转化结果表明,随着启动子拷贝数的升高,报告基因的表达水平呈上升趋势,且  $\Delta p2C$  启动子是全长 *cbh1* 启动子强度的 2.1 倍,  $\Delta p4C$  启动子是全长 *cbh1* 启动子强度的 2.4 倍,但当拷贝数增加到 6 时,报告基因的表达水平与 4 拷贝转化子持平<sup>[21]</sup>。采用理性设计进行区段操作的方式可以提高丝状真菌异源基因的表达效率,也为丝状真菌的遗传改造和分子育种提供了一条新的行之有效的途径。

对启动子的关键区段进行操作,是启动子改造的有效方式。和定点突变改造启动子类似,这也有赖于对启动子调控下游基因转录的顺式、反式元件分子机理的高度明晰。

### 3 随机突变

随机突变的方法需要较大的突变库容量。由于丝状真菌的转化效率远低于大肠杆菌和低等真菌(如酿酒酵母),所以应用随机突变的方法对丝状真菌的启动子改造的案例较少。但随着技术的进步,丝状真菌的转化效率可能会获得较大提升。因此,作为一种有重要应用前景的方法,本综述中也列入此部分研究进展。易错 PCR<sup>[22]</sup>、DNA shuffling<sup>[23]</sup> 和使用核苷酸类似物突变的<sup>[24]</sup> 方法都属于随机突变的方式。在不了解启动子调控机制的前提下,使用随机突变法可以获得较好的改造效果。易错 PCR 是使用保真率较低的 Taq 酶对启动子基因进行聚合酶链反应扩增,该法可得到随机突变的启动子 DNA 库。DNA shuffling 是获得随机断裂的 DNA 片段并进行重组,然后产生大量新的启动子序列。在启动子改造中,应用 DNA shuffling 的方法获得的突变体库容量较高,得到活性增强的启动子的概率也较高。最近核苷酸类似物也被应用于启动子改造:该法在 PCR 反应中引入核苷酸类似物,可以引起很高的突变率,从而产生不同强度的启动子。Du 等<sup>[25]</sup> 对代谢途径中多个基因中不同的启动子采用核苷酸类似物进行突变,通过绿色荧光蛋白筛选获得 10 种强度不同的启动子,在代谢途径中这些不同强度的启动子组合能够实现代谢途径的合理优化。如果将能此法应用在木糖和纤维二糖代谢途径中,则可提高代谢通路的效率,对工业生产效益最大化具有重要意义。

### 4 展望

启动子作为转录调控的中心,一直是研究的热点,对启动子改造的研究已经快速和深入的发展<sup>[26]</sup>。

通过定点突变和区段操作改造启动子的方法已经相当成熟。在今后的丝状真菌启动子改造研究中,需要考虑使用引入随机突变的方法,而这高度依赖于转化效率的提高。另外,在丝状真菌的基因工程改造中,对反式作用因子进行改造也是需要值得注意<sup>[27]</sup>,有报道称过表达转录激活因子能够提高丝状真菌蛋白表达量<sup>[28]</sup>。但需要关注的是,涉及调控丝状真菌的启动子,如 *cbh1* 和 *glaA* 启动子的转录因子,并不是专一性的只调控这些基因。例如, *Crel* 是一个全局性的调节因子,能够调节很多代谢过程。所以在对这些关键因子进行操作时可能会对宿主产生生理和形态等影响。因此,常常需要进行多步改造才能使丝状真菌达到应用的要求。

#### 参考文献:

- [1] BENEYTON T, WIJAYA I P M, POSTROS P, et al. High-throughput screening of filamentous fungi using nanoliter-range droplet-based microfluidics[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 27223.
- [2] SALOHEIMO M, PAKULA T M. The cargo and the transport system: Secreted proteins and protein secretion in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) [J]. Microbiology, 2012, 158(1): 46-57.
- [3] MEYER V. Genetic engineering of filamentous fungi: progress, obstacles and future trends [J]. Biotechnology Advances, 2008, 26(2): 177-185.
- [4] 刘德辉, 黄毓茂, 徐蕙. 丝状真菌异源蛋白高效表达的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(2): 221-224. LIU D H, HUANG Y M, XU H. Advance in research on high expression of heterologous protein in filamentous fungi[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2010, 23(2): 221-224.
- [5] 林涛, 黄建忠. 丝状真菌启动子研究进展[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(7): 2862-2863, 2865. LIN T, HUANG J Z. Research advance on promoters for heterologous gene expression in filamentous fungi [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(7): 2862-2863, 2865.
- [6] 唐德洋, 魏东芝, 杨忠, 等. 启动子 *cbh1* 的改造与里氏木霉通用质粒载体的构建[J]. 工业微生物, 2014, 44(4): 33-38. TANG C Y, WEI D Z, YANG Z, et al. Improvement of promoter *cbh1* and the construction of heterologous gene expression multi-purpose vector of *Trichoderma reesei* [J]. Industrial Microbiology, 2014, 44(4): 33-38.
- [7] PUNT P J, DINGEMANSE M A, KUYVENHOVEN A, et al. Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans gpdA* gene encoding glycerol-

- dehyde-3-phosphate dehydrogenase[J]. *Gene*, 1990, 93(1):101-109.
- [8] POLLI F, MEIJRINK B, BOVENBERG R A L, et al. New promoters for strain engineering of *Penicillium chrysogenum* [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2015, 89:62-71.
- [9] THRONSET W, KIM S, BOWER B, et al. Flow cytometric sorting of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* for improved strains [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010, 47(7):335-341.
- [10] RAHMAN Z, SHIDA Y, FURUKAWA T, et al. Evaluation and characterization of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(5):899-908.
- [11] TAKASHIMA S, IIKURA H, NAKAMURA A, et al. Analysis of Cre1 binding sites in the *Trichoderma reesei cbh1* upstream region [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, 145(3):361-366.
- [12] ZOU G, SHI S H, JIANG Y P, et al. Construction of a cellulase hyper-expression system in *Trichoderma reesei* by promoter and enzyme engineering [J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11(1):21.
- [13] ILMÉN M, ONNELA M L, KLEMSDAL S, et al. Functional analysis of the cellobiohydrolase I promoter of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 1996, 253(3):386.
- [14] VERDOES J C, PUNT P J, STOUTHAMER A H, et al. The effect of multiple copies of the upstream region on expression of the *Aspergillus niger* glucoamylase-encoding gene [J]. *Gene*, 1994, 145(2):179-187.
- [15] ZEILINGER S, EBNER A, MAROSITS T, et al. The *Hypocrea jecorina* HAP 2/3/5 protein complex binds to the inverted CCAAT-box (ATTGG) within the *cbh2* (cellobiohydrolase II-gene) activating element [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2001, 266(1):56-63.
- [16] ARO N, ILMÉN M, SALOHEIMO A, et al. ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1):56-65.
- [17] MINETOKI T, NUNOKAWA Y, GOMI K, et al. Deletion analysis of promoter elements of the *Aspergillus oryzae agdA* gene encoding  $\alpha$ -glucosidase [J]. *Current Genetics*, 1996, 30(5):432-438.
- [18] LIU L, LIU J, QIU R X, et al. Improving heterologous gene expression in *Aspergillus niger* by introducing multiple copies of protein-binding sequence containing CCAAT to the promoter [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, 36(6):358-361.
- [19] RIES L, BELSHAW N J, ILMÉN M, et al. The role of CRE1 in nucleosome positioning within the *cbh1* promoter and coding regions of *Trichoderma reesei* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(2):749-762.
- [20] LIU T, WANG T H, LI X, et al. Improved heterologous gene expression in *Trichoderma reesei* by cellobiohydrolase I gene (*cbh1*) promoter optimization [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2008, 40(2):158-165.
- [21] 刘侗. 多拷贝策略构建瑞氏木霉外源基因系列表达载体 [D]. 济南: 山东大学, 2005.
- LIU T. Construction of expression vectors in *T. reesei* with multicopies strategy [D]. Ji'nan: Shandong University, 2005.
- [22] TACHIOKA M, SUGIMOTO N, NAKAMURA A, et al. Development of simple random mutagenesis protocol for the protein expression system in *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1):199.
- [23] TIAN X L, XU X, XIAO W. Novel method for genomic promoter shuffling by using recyclable cassettes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(22):7042-7047.
- [24] ALPER H, FISCHER C, NEVOIGT E, et al. Tuning genetic control through promoter engineering [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(36):12678-12683.
- [25] DU J, YUAN Y B, SI T, et al. Customized optimization of metabolic pathways by combinatorial transcriptional engineering [J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(18):e142.
- [26] 汤方, 涂慧珍. 真核启动子研究进展 [J]. *林业科技开发*, 2015, 29(2):7-12.
- TANG F, TU H Z. Research progress on eukaryotic promoter [J]. *Forestry Science and Technology*, 2015, 29(2):7-12.
- [27] SU X Y, SCHMITZ G, ZHANG M L, et al. Chapter one-heterologous gene expression in filamentous fungi [J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2012, 81:1-61.
- [28] ZHANG X Y, LI Y H, ZHAO X Q, et al. Constitutive cellulase production from glucose using the recombinant *Trichoderma reesei* strain overexpressing an artificial transcription activator [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 223:317-322.

(责任编辑:米慧芝)