



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Identification and characterization of starch and inulin modifying network of *Aspergillus niger* by functional genomics

Yuan, X.L.

Citation

Yuan, X. L. (2008, January 23). *Identification and characterization of starch and inulin modifying network of Aspergillus niger by functional genomics*. Institute of Biology Leiden (IBL), Group of Molecular Microbiology, Faculty of Science, Leiden University. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12572>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12572>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

黑曲霉是一种广泛存活于植物残体中的丝菌体式真菌。作为一种腐生菌，它能产生大量不同的水解酶，用来降解环境中植物的高分子多糖成分为小分子化合物，从而为其本身提供能源和碳源。这些酶大都很多（潜在的）用途，比如：在面包业，淀粉业，织物业以及食品和饲料工业等。这些用途近来吸引了大量的研究兴趣。通过遗传、生化、生物信息等途径来开发黑曲霉旨在更加清楚地了解其对糖类物质的降解、修饰网络，从而提高酶的产量和底物的利用率提供科学依据。另外，从黑曲霉中发现新活性酶也是一个主要因素。近年来由荷兰的生物技术公司 DSM 和美国的 DOE 基因组研究所对黑曲霉的基因组测序的完成，以及黑曲霉的基因芯片技术的具备，使得从黑曲霉中发现新活性酶以及从基因组水平上来分析其机体内的碳水化合物（糖类）降解的转录调控网络成为可能。

这篇论文，我们的主要研究目标是探索黑曲霉降解、修饰碳水化合物的分子机制。比如，黑曲霉是如何感受到周围环境中存在的不同碳源的；某种特定诱导碳源的存在或产生又是如何激活这些降解酶基因的转录表达的。我们的研究重点在于寻找多糖类物质如淀粉、菊糖、以及它们的衍生物在黑曲霉体内的降解途径中出现的诱导分子和转录调节因子。另外，由这些结构基因编码的酶是如何催化不同的碳源的，以及这些酶的生理功能是什么，也是我们研究的重要方面。

本论文的**第一章**概括了黑曲霉作为酶产生菌的重要性以及当前有关淀粉和菊糖降解修饰酶的知识。有关碳水化合物降解的酶的转录表达和其蛋白产量在有机体内是高度调节的。这种调节主要由各种不同的广泛转录因子（如 CreA、AreA、PacC 等），和特定糖类降解途径的转录因子（如 AmyR 和 InuR）来控制的。这一章主要给读者了解有关调节基因表达的转录因子的一些背景信息，同时也详细阐述了与碳水化合物降解有关的酶编码基因的调节机制以及不同转录因子的一些重要特征。

为了发现降解淀粉、菊糖有关的新活性酶，我们采用了两种方法。第一种方法在**第二章**里阐述。该方法是利用克隆技术来构建淀粉和菊糖特定的黑曲霉基因表达文库。这些基因表达文库分别构建在以细菌和酵母为转化体的载体上。分子分析证明这些基因表达文库质量尚好并被转化到细菌和酵母体内。由于 cDNA 翻译的蛋白表达量以及蛋白表达转化体的数量的不足，目前只筛选出少量的转化体。该章末尾提出了几种改善 cDNA 表达文库的构建及筛选方法的建议和措施。

第二种方法是利用已知活性酶的序列来调查黑曲霉的基因组，从而获得相似序列编码的蛋白。在本文的**第三章**，我们介绍了植物淀粉可被 α -淀粉酶，葡萄糖化酶及 α -葡萄糖苷酶降解成小分子的葡萄糖。这些酶分别属于糖苷水解酶系 13、15 和 31 家族，因此在第三章里我们主要调查了黑曲霉基因组中可能编码糖苷水解酶系 13、15 和 31 家族的酶。结果我们

发现了 17 个新蛋白酶。通过基因组序列以及它们的转录表达水平调节的综合分析, 结果显示大部分基因表现出不同寻常的转录调节模式。也就是说, 它们既不受淀粉降解途径的诱导物-麦芽糖的诱导, 也不受淀粉降解调节因子-AmyR 的调控。只有两种酶, α -糖苷酶 AgdB 和 α -淀粉酶 AmyC, 可能具备降解淀粉的活性。其它的蛋白酶包括胞内酶、胞壁相关的酶, 很有可能涉及到细胞壁的组成成分 α -葡聚糖的修饰过程, 而不涉及淀粉的降解过程。这些假设在第三章中得到详细讨论。

在前一章提到的 GH13 谱系的蛋白中, 有三个蛋白酶 (AgtA、AgtB、AgtC) 尽管与真菌淀粉酶类有高度的序列相似性, 但其具有另外的 C 末端信号肽序列, 即糖基化磷脂酰肌醇 (GPI) 的附着信号序列, 并且缺乏某些 α -淀粉酶的高度保守的氨基序列。该论文的第四章描述了这些蛋白酶在黑曲霉中的过量表达、提取和纯化的功能性质, 以及其编码基因的删除和过量表达所表现出的生理表现特性。我们发现 AgtA 和 AgtB 均表现出糖苷转移酶的特征。其中 AgtA 的基因删除表现出对细胞壁干扰物 Calcofluor White (CFW) 强烈的敏感性, 表明该基因的缺失致使细胞壁内部结构的完整性受到破坏。蛋白序列分析显示 AgtA 和 AgtB 的同源蛋白也出现在其它有 α -葡聚糖成份的细胞壁的真菌中, 而不在缺乏 α -葡聚糖的细胞壁的酵母中。这一现象进一步表明 AgtA 蛋白酶活性与细胞壁结构有关。

糖苷水解酶系 32 家族蛋白有可能涉及到菊糖和它的合成底物-蔗糖的降解过程。在第五章里, 我们调查了黑曲霉基因组来寻找属于 GH32 谱系的基因。除了已知的三种胞外酶-SucA, InuE 和 InuA 外, 我们还发现了另外两种胞内酶, SucB 和 SucC。转录分析表明这些胞外酶是协同调节的并受菊糖和蔗糖诱导的。它们的转录水平也受到碳催化代谢抑制因子 CreA 的控制。进一步的实验分析表明在黑曲霉体内, 是蔗糖或它的衍生物, 而不是果糖, 作为诱导物来诱导菊糖分解酶基因的转录表达的。

在第六章里, 我们调查了其中一个 GH32 谱系的胞内降解酶-SucB, 检查其是否在菊糖或蔗糖的降解中起着产生诱导物的作用。我们对 SucB 蛋白的系统进化、分子和生化特性进行了研究。SucB 的过量表达并纯化的蛋白具有胞内降解蔗糖酶的特性并兼有转化果糖的活性。该基因的删除并没有改变黑曲霉在菊糖或蔗糖中生长特征, 表明 SucB 蛋白并不在菊糖或蔗糖的降解中起着产生诱导物的作用。但是 SucB 有可能在细胞内的蔗糖转化成果糖、葡萄糖或其它小分子的寡糖中行使一定的功能。

正如在第五章中提到的, 胞外菊糖分解酶类在转录水平上是协同调节的并受蔗糖和菊糖的诱导, 这个结果提示在菊糖的降解途径中存在着一个共同的转录调节因子, 在诱导物出现的情况下, 该调节因子激活其结构基因的转录表达。在本文的第七章中, 我们详细阐述了这个新的菊糖转录激活因子-InuR 的发现及其特征。InuR 的发现是基于黑曲霉基因组中菊糖酶类基因群的调查。inuR 基因靠近 SucB 基因, 二者之间隔着一个糖类运输蛋白基因 (An15g00310)。inuR 基因的删除导致黑曲霉在菊糖和蔗糖中的严重生长缺陷。菊糖和蔗糖对胞外菊糖酶基因以及这糖运输蛋白基因的诱导是依赖于 InuR 调节因子的。基因组的转录表达分析发现另外三个糖运输蛋白基因 (An15g04060, An15g03940 and An17g01710), 它们也受到蔗糖的强烈诱导并且依赖于 InuR。这些糖运输蛋白基因的具体功能, 特别是 An15g00310 编码的糖运输蛋白是个很有意义的课题并且正在用生化分析的手段研究中。由电脑模拟分析所有 InuR 调控的基因的启动子我们发现一个潜在的 InuR 结合位点-CCGN8CGG, 该序列很类似于淀粉降解调节因子-AmyR 结合位点-CCGN8C/AGG。双重基因的删除分析揭示了 InuR

和 AmyR 的独立调控功能。究竟 InuR 和 AmyR 是如何辨认它们各自的目标基因以及什么因素决定它们的结合特异性将是个有意义的课题并有待于进一步研究。

在这组菊糖酶基因谱中，我们发现 *inuE* 是受到菊糖和蔗糖诱导最强的基因。在本文的**第八章**，我们利用 *inuE* 基因的启动子，分别结合 *racA-G12V* 和 GFP 报告基因，找到了一个新的筛选方法来分离出菊糖或蔗糖信号途径中的突变体。通过这遗传筛选方法结合突变体的辨别我们能够找到那些产生诱导分子，运输或感应诱导分子的蛋白，以及那些激活菊糖降解途径的酶基因转录因子。该方法可以被广泛运用到寻找转录因子的突变体。在建立这个可能性的筛选方法的过程中，我们发现棉籽糖也有诱导菊糖酶基因的特性。

基于本论文最后四个章节的结果，我们提出了一个黑曲霉体内菊糖降解信号途径的假说模型。该**假说模型**具体陈述在第八章的末尾。

