

## 丝状真菌胞外蛋白高效分泌机制的研究进展\*

周娜娜 王禄山 公维丽 赵越 张怀强\*\*

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

**摘要** 丝状真菌由于其胞外蛋白分泌的高效性, 成为生产酶制剂的高效细胞工厂. 近年来针对真核生物胞外蛋白分泌途径的研究发现, 丝状真菌蛋白的分泌途径相比其他真核生物具有高效分泌的特性. 为了研究丝状真菌高效分泌的机制, 本文总结了近年来丝状真菌分泌途径的最新研究进展, 并且选取了分泌途径中关键环节的数种蛋白进行分析, 通过与其他真核生物相关蛋白进行结构与序列比对, 推测了丝状真菌胞外蛋白高效分泌的可能机制.

**关键词** 丝状真菌, 顶端分泌, 高效分泌机制, 序列比对, 结构比对

**学科分类号** Q6, Q93

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2015.0233

木质纤维素是地球上储量丰富的可再生资源, 其复杂的化学组成和超分子结构形成了抗降解屏障<sup>[1-2]</sup>, 影响了其酶解转化效率. 丝状真菌在亿万年的进化过程中逐渐进化出多种胞外糖苷水解酶系, 可以有针对性地高效降解木质纤维素. 目前, 丝状真菌这种高效分泌特性备受关注, 相对于酵母菌等真核生物的经典分泌途径, 丝状真菌的顶端分泌可能是其高效分泌的原因<sup>[3]</sup>. 丝状真菌参与分泌途径的相关蛋白包含多种, 各自行使特定的功能. 本文总结了近年来丝状真菌分泌途径的最新研究进展, 选取分泌途径中关键环节的数种蛋白进行分析, 通过与其他真核生物相关蛋白进行结构与序列比对, 推测了丝状真菌蛋白质高效分泌的可能机制.

### 1 丝状真菌胞外蛋白的高效分泌特性

与其他真核生物相比, 部分丝状真菌具有高效的蛋白分泌能力, 主要体现在分泌蛋白的总量和种类上. 总量上, 某些曲霉和木霉分泌的蛋白产量可达 30 g/L 以上<sup>[4]</sup>, 例如黑曲霉能产 25~30 g/L 葡糖淀粉酶, 瑞氏木霉能够产生 100 g/L 胞外蛋白<sup>[5]</sup>. 而目前的研究发现仅有几种酵母菌(毕赤酵母菌和汉逊酵母菌)中分泌蛋白可以达到 g/L 级的水平<sup>[6]</sup>. 种类上, 丝状真菌具有分泌多种胞外蛋白的能力. 本课题组主要研究其本源表达的降解木质纤维素的酶类<sup>[1, 7-10]</sup>, 由于木质纤维素复杂的超分子结构导致丝状真菌能够产生多种降解酶类<sup>[9-10]</sup>. 以 4 种已完

成基因组测序的丝状真菌为例: 瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)理论上可以产生 67 种木质纤维素降解酶类<sup>[11]</sup>, 黑曲霉(*Aspergillus niger*)则具有产生 114 种降解酶类的潜力<sup>[12-13]</sup>, 草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)根据基因组显示可以产生 105 种酶类<sup>[8]</sup>, 而米曲霉(*Aspergillus oryzae*)最多, 理论产酶种类可高达 154 种<sup>[14]</sup>.

已有研究表明丝状真菌的蛋白高效分泌一般发生在菌丝的顶端或亚顶端区域<sup>[15]</sup>, 即顶端分泌<sup>[9]</sup>. 有人利用葡糖淀粉酶: 绿色荧光融合蛋白(GLA: GFP)来研究黑曲霉中蛋白的分泌过程, 观察到 GFP 荧光主要分布于菌丝顶端<sup>[16]</sup>. 同样, 在粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)中的相关研究也获得类似结果, 利用绿色荧光蛋白质标记参与分泌途径的蛋白, 发现参与分泌途径的这些蛋白组分也主要集中于菌丝顶端(图 1a, b)<sup>[3, 17]</sup>. 这均说明丝状真菌蛋白分泌主要发生在菌丝顶端, 而这种顶端分泌可能在一定程度上决定了丝状真菌的高效分泌.

相比其他真核生物, 丝状真菌拥有更为强大的分泌途径, 包括 SRP 信号传导、内质网内的高效修饰、错误折叠蛋白的快速清除、膜泡与靶膜间的

\* 国家自然科学基金(31370111, 31170071)和山东省自然科学基金(ZR2013CM038)资助项目.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 15253169279, E-mail: zhq@sdu.edu.cn

收稿日期: 2015-11-08, 接受日期: 2015-12-09

融合以及顶端分泌等。丝状真菌整体的分泌过程主要包括三个阶段: 首先分泌相应蛋白的 mRNA 在核糖体上合成为多肽并靶向内质网; 随后多肽在内质网内进行折叠与修饰, 发生错误折叠的蛋白被清

除; 最终折叠正确的蛋白通过膜泡运输被分泌到细胞膜外(图 1c)。本文通过分析这三个过程中涉及的关键蛋白的结构和功能, 试图阐明丝状真菌的高效分泌机制。

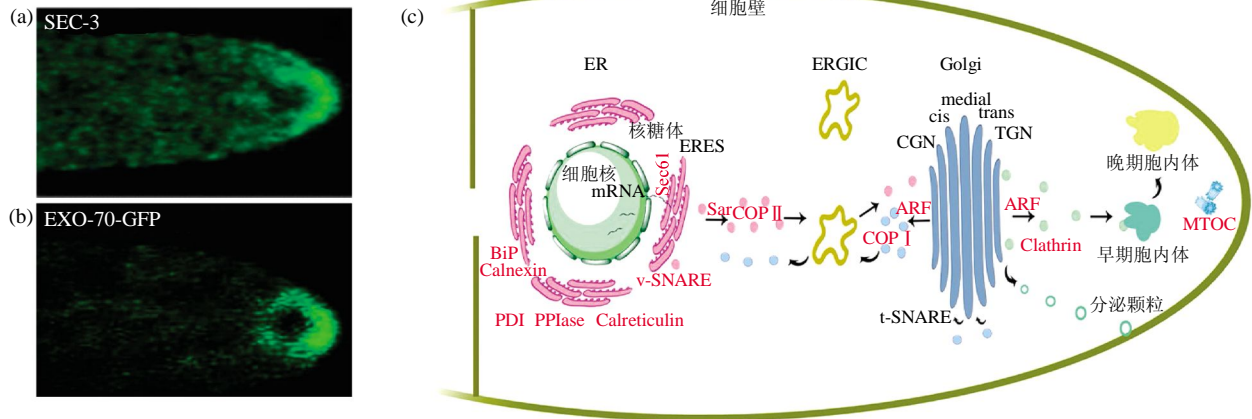


Fig. 1 The apocrine secretion of filamentous fungi

图 1 丝状真菌的顶端分泌

(a) 粗糙脉孢菌 SEC-3 组分的顶端定位, 图片尺寸  $10 \mu\text{m}^{\text{[17]}}$ . (b) 粗糙脉孢菌顶体 EXO-70 组分的顶端定位, 图片尺寸  $500 \text{nm}^{\text{[1]}}$ . (c) 丝状真菌的分泌途径概览<sup>[18]</sup>. 图中黑色标注为细胞器, 参与分泌途径的主要细胞器: ER, 内质网; ERES, 内质网输出位点; ERGIC, 内质网-高尔基体中间腔室; Golgi, 高尔基体, 包括顺面网状结构(CGN)、顺面膜囊(cis)、中间膜囊(medial)、反面膜囊(trans)和反面网状结构(TGN). 红色标注为参与分泌途径的蛋白: BiP, 重链结合蛋白; Calnexin/Calreticulin, 钙连蛋白和钙网蛋白; PDI, 蛋白二硫键异构酶; PPase, 肽基脯氨酰异构酶; Sec61, ER 易位子; v-SNARE, 供体膜上有被小泡的整合蛋白; Sar, 参与 ER 膜转运膜泡出芽的小 GTP-结合蛋白; COP II, 介导蛋白从 ER 到 Golgi 顺向运输的有被小泡; COP I, 介导蛋白从 Golgi 到 ER 逆向运输的有被小泡; ARF, 参与 COP I 和网格蛋白形成的 GTP 结合蛋白; Clathrin, 介导蛋白从 TGN 到质膜运输的网格蛋白; MTOC, 微管组织中心, 对于蛋白的运输和分泌起定向作用。

## 2 胞外蛋白分泌的初始步骤: 多肽靶向内质网

真核生物中胞外蛋白分泌的第一阶段是核糖体上合成的多肽被转运至内质网, 即多肽靶向内质网。这一过程主要包括两种途径: 翻译后转运途径(图 2a-1)和共翻译转运途径(图 2a-2)。这两种转运途径所涉及的蛋白在黑曲霉<sup>[19]</sup>和构巢曲霉<sup>[20]</sup>中已被报道, 因此推测丝状真菌中应存在这两种途径。为了阐明丝状真菌分泌途径的独特性, 需要对分泌过程中行使关键功能的蛋白进行分析, 从而推测其高效分泌的原因。

以共翻译转运途径为例, 在这条途径中发挥关键作用的蛋白质成分是信号识别颗粒(signal recognition particle, SRP)及其受体(signal recognition particle receptor, SR)(图 2b)。SRP 的关键成分是 SRP54 和 SRP RNA<sup>[21-22]</sup>, SRP54 包括 2 个结构域: NG 结构域和 M 结构域<sup>[22]</sup>, SRP RNA 促进 SRP54 与 SR 的

结合, 加速 GTP 的水解<sup>[21]</sup>(图 2c)。SR 是膜锚定蛋白, 分为  $\alpha$  亚基与  $\beta$  亚基,  $\alpha$  亚基的 NG 结构域与 SRP54-NG 结构域形成异二聚体促使 SRP54 与 SR 结合,  $\beta$  亚基则将核糖体-SRP-SR 复合体拉至内质网膜附近<sup>[23]</sup>(图 2c), 最终与内质网膜上的易位子发生相互作用, 将多肽运至内质网。

在整个共翻译转运途径中, SRP 发挥最重要的作用。SRP 通过识别信号序列完成对共翻译转运途径的启动, 这是转运过程关键的一步。首先, 当信号序列在核糖体上刚刚合成, 便暴露于核糖体多肽出口处(图 2b), SRP 就会快速识别并与之结合<sup>[24]</sup>。随后, SRP 与核糖体-新生肽复合体相互作用, 诱导 SRP54 的 NG 与 M 结构域之间形成 GM linker<sup>[21]</sup>(图 2c)。GM linker 与 M 结构域共同形成疏水核心, 用于信号序列的结合<sup>[25]</sup>(图 2d)。信号序列在不同的分泌蛋白中各不相同, 但这些信号序列的功能结构域基本一致, 即: 带正电的 N 端区域、疏水区域和含信号肽酶作用位点的极性 C 端区域<sup>[21, 26]</sup>。

信号序列 N 端通常存在一个或几个带正电的碱性氨基酸，可与 GM linker 带负电的酸性氨基酸形成静电相互作用；信号序列的疏水区域是 SRP 识别

与结合的关键区域，该疏水区域的完整性是 SRP 识别的必要条件<sup>[26]</sup>(图 2d)。将粟酒裂殖酵母菌 (*S. pombe*)<sup>[27]</sup>分泌蛋白的信号序列与本课题组研究

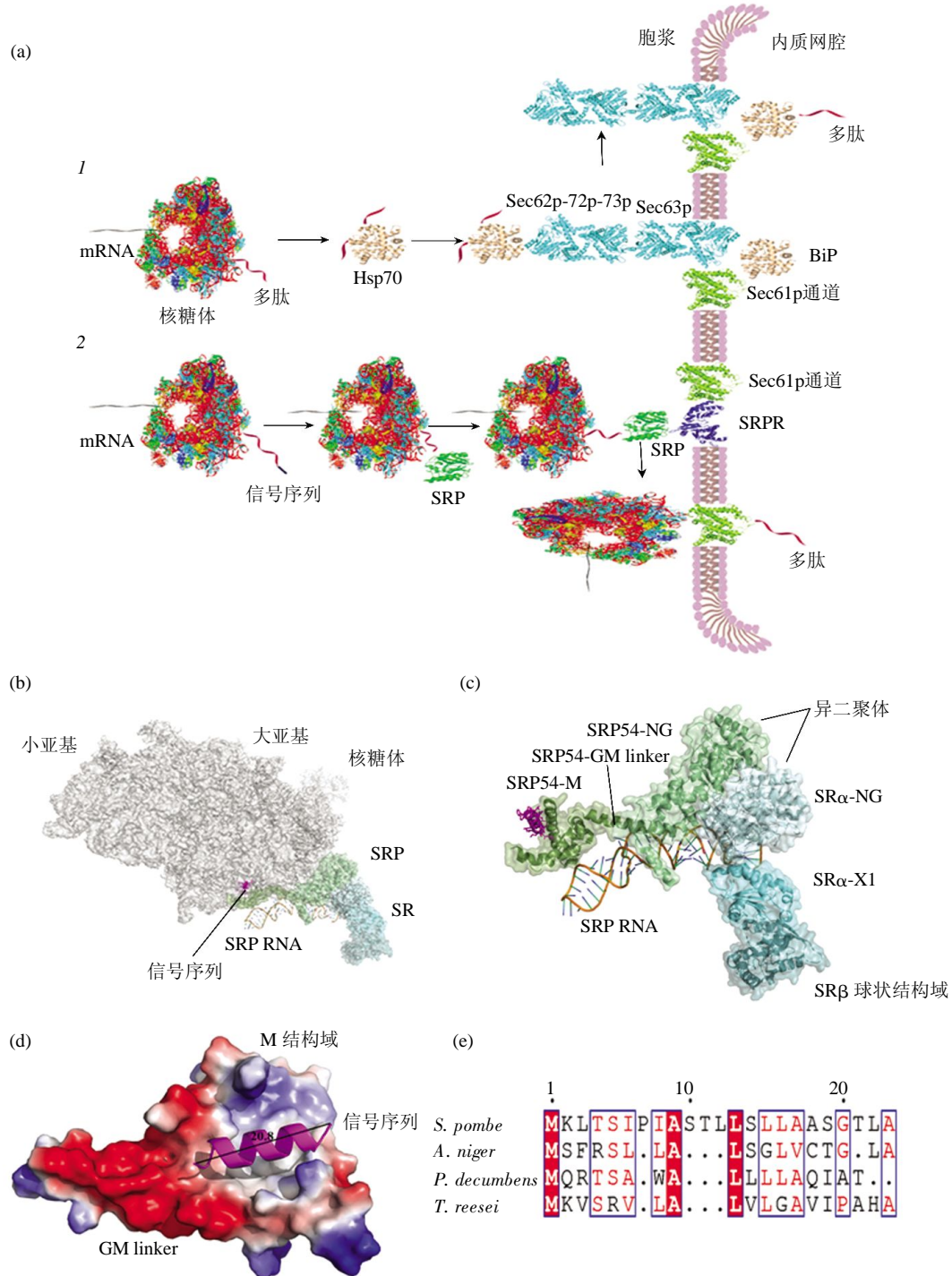


Fig. 2 New peptide chain enters into endoplasmic reticulum through signal sequence

图 2 新生肽链通过信号序列靶向内质网

(a) 多肽靶向内质网的途径<sup>[28]</sup>: 1, 翻译后转运途径; 2, 共翻译转运途径。核糖体 PDB 号 4U51; Hsp70/BiP: 分子伴侣, PDB 号 3QFU; Sec62p-72p-73p/Sec63p: PDB 号 3HL2; Sec61p: 易位子, PDB 号 2ZQP; SRP: 信号识别颗粒, PDB 号 3ZN8; SRPR: 信号识别颗粒受体, PDB 号 2FH5。 (b) SRP 对于核糖体多肽出口位点的信号序列的识别<sup>[29]</sup>。此结构由 PDB 号为 2J28、2GO5、2XXA 和 4LF4 的 4 种蛋白组合而成。 (c) SRP 与 SR 的相互作用。此结构由 PDB 号为 2J28、2GO5、2XXA 和 4LF4 的 4 种蛋白组合而成。 (d) SRP54 疏水核心与信号序列的结合。 (e) 粟酒裂殖酵母菌与 3 种丝状真菌分泌蛋白信号序列的序列比对。

的黑曲霉(*A. niger*)、斜卧青霉(*P. decumbens*)、瑞氏木霉(*T. reesei*)分泌蛋白的信号序列进行序列比对分析(图 2e), 发现它们具有信号序列的共性: 第一个氨基酸残基均为甲硫氨酸(M), 随后存在带有正电的精氨酸或赖氨酸(R/K), 最后是由疏水性氨基酸构成的疏水区域。但是, 也存在明显的差异, 3 种丝状真菌分泌蛋白的信号序列疏水区域的长度与酵母菌的不一致。SRP54-M 结构域形成的疏水核心的大小是一定的, 大约 20.8Å(图 2d), 对应信号序列的氨基酸数应为 16~17 个(信号序列主要二级结构为  $\alpha$  螺旋)。而与酵母菌相比, 丝状真菌分泌蛋白的信号序列疏水区域的长度更适合。除此之外, 丝状真菌分泌蛋白的信号序列疏水性更强, 更利于信号序列与相应的 SRP54-M 疏水核心的结合。这些因素都会影响 SRP 的识别与结合效率, 进而影响分泌蛋白的整体靶向效率。因此, 通过分析信号序列的结构特点, 研究其与 SRP 之间的识别和结合关系, 可以深入认识丝状真菌蛋白分泌初始阶段高效性的结构基础与分子机制。

### 3 胞外蛋白分泌的关键步骤: 内质网内的折叠修饰及错误折叠蛋白的清除

真核生物内质网的重要功能是促进蛋白质进行正确的折叠与修饰, 此步对于胞外蛋白形成正确的空间构象非常关键。该过程需要一系列分子伴侣和折叠酶的协助, 包括: 钙连蛋白与钙网蛋白(calnexin/calreticulin)、重链结合蛋白(binding protein, BiP)和蛋白二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)等<sup>[18]</sup>。研究显示, 在粗糙脉孢菌<sup>[29-30]</sup>和构巢曲霉<sup>[31-32]</sup>中发现了 calnexin 和 PDI 的同源蛋白, 在黑曲霉<sup>[33-35]</sup>、瑞氏木霉<sup>[36]</sup>、烟曲霉<sup>[37]</sup>和米曲霉<sup>[38]</sup>中也鉴定出 calnexin、PDI 和 Bip 的同源蛋白。由此推测, 这些分子伴侣和折叠酶在丝状真菌中也是普遍存在的, 并且发挥着重要的作用。

本课题组研究的木质纤维素降解酶多数是糖基化修饰的蛋白<sup>[1, 7-10]</sup>——糖蛋白, 其在内质网中的加工过程为: 含聚糖的多肽在葡糖苷酶作用下形成单糖基化多肽, 被识别并结合到 calnexin/calreticulin 上<sup>[39]</sup>; 随后, 招募分子伴侣和折叠酶对糖蛋白进行折叠与修饰, 最终形成初步折叠的糖蛋白(图 3a-折叠蛋白部分)。糖蛋白在内质网内的折叠与修饰是蛋白质分泌过程的限速步骤, 它们的折叠与修饰的有效性决定了丝状真菌蛋白分泌的效率。PDI 蛋白是糖蛋白在内质网内进行正确的折叠与修饰时必

不可少的组分, 它不仅是糖蛋白成熟过程中二硫键形成和异构化的催化剂, 还是协助蛋白质折叠的分子伴侣<sup>[40-41]</sup>。PDI 蛋白包括 4 个硫氧还蛋白结构域和 1 个 C 端结构域<sup>[42]</sup>。4 个硫氧还蛋白结构域形成弯曲的 U 型, 分别称为 a、b、b' 和 a' 结构域。其中 b'-a' 结构域对于蛋白的识别起决定作用。a' 结构域活性位点的氧化导致 b'-a' 结构域的重排, 诱导 b' 与 a' 结构域的分离, 使 PDI 蛋白的疏水表面暴露出来, 用于相应底物的识别<sup>[43]</sup>。将黑曲霉(*A. niger*)<sup>[33]</sup>与酿酒酵母菌(*S. cerevisiae*)<sup>[44]</sup>的 PDI 蛋白结构相比较(图 3b), 发现两者都包含 5 个结构域, 形成内表面疏水的 U 型结构, 用于结合底物; 但不同的是, 黑曲霉的 a 结构域比酵母菌要更远离对应的 a' 结构域, U 型开口更大, 使得底物更容易接触 U 型结构的内表面——疏水面, 这可能使得黑曲霉 PDI 蛋白对于糖蛋白的修饰更高效。由此可见, 通过比较丝状真菌与其他真核生物的 PDI 等分子伴侣和折叠酶的结构与功能差异, 可以了解丝状真菌参与修饰过程的相关蛋白结构与高效修饰间的相关性。

内质网中的糖蛋白经过折叠与修饰后, 折叠正确的糖蛋白离开内质网, 进入高尔基体进行再加工。而错误折叠的糖蛋白通过内质网相关蛋白降解系统(ERAD)被去除<sup>[45]</sup>: 这些糖蛋白首先在糖基转移酶(UGGT1)的作用下被重新单糖基化, 重新进行折叠过程。循环后仍然未正确折叠的糖蛋白被从折叠装置中移除, 进入 ERAD 途径进行降解(图 3a-未折叠蛋白部分)<sup>[46]</sup>。ERAD 途径对于错误折叠蛋白的降解包括两个关键步骤<sup>[47]</sup>: a. 糖蛋白的聚糖链上形成  $\alpha$ -1, 6-糖苷键连接的甘露糖末端, 这是蛋白质降解所需的信号<sup>[47]</sup>。b. OS9 蛋白识别并结合  $\alpha$ -1, 6-糖苷键连接的甘露糖末端。同样的, 在瑞氏木霉<sup>[18]</sup>、构巢曲霉<sup>[48]</sup>和黑曲霉<sup>[49]</sup>中观察到内质网相关蛋白降解系统相关基因的出现, 这说明丝状真菌可能也通过这种途径进行错误折叠蛋白的降解去除。参与降解系统的同源蛋白在丝状真菌中已得到表征, 以发挥关键作用的 OS9 蛋白为例, OS9 蛋白的重要功能是识别糖蛋白上的 6-磷酸-甘露糖残基, 此蛋白具有识别 6-磷酸-甘露糖残基的受体结构域(mannose-6-phosphate receptor homology domain, MRH)。此结构域是平坦的  $\beta$  桶结构, 高甘露糖类型的聚糖结合在  $\beta$  桶 C 端开口处, 主要是对于聚糖链中的第一个和第二个由  $\alpha$ -1, 6-糖苷键连接的甘露糖残基的识别<sup>[50]</sup>(图 3c)。OS9-MRH 结构域对于底物的特异性识别主要取决于活性架构

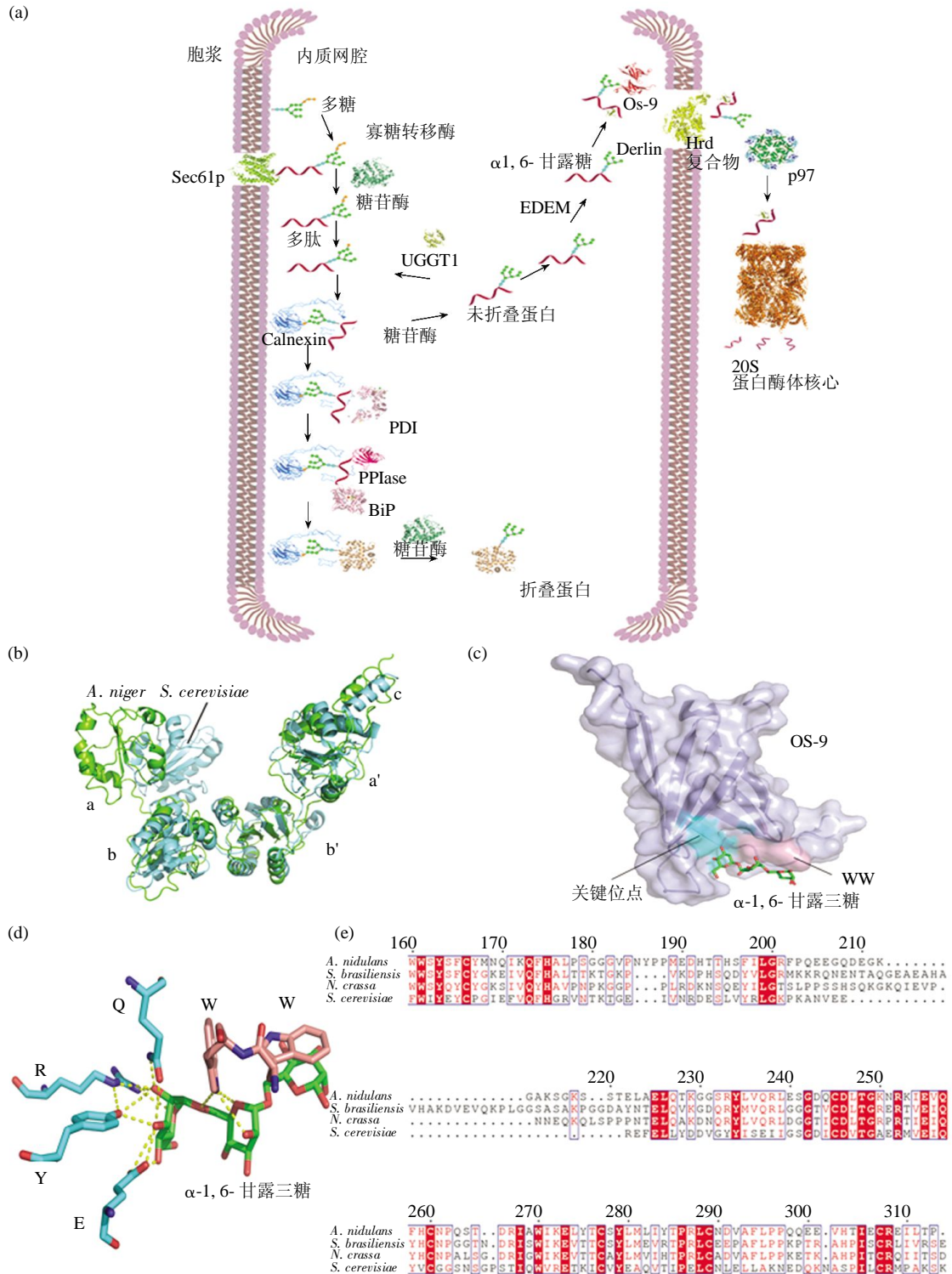


Fig. 3 The processing and degradation of glycoproteins in the endoplasmic reticulum

图3 糖蛋白在内质网中的加工与降解

(a) 糖蛋白在内质网内的折叠与修饰及错误折叠蛋白的清除<sup>[29]</sup>。寡糖转移酶(oligosaccharides transferase): PDB号3UAN; Sec61p: 内质网易位子, PDB号2ZQP; 糖苷酶(glucosidase): PDB号1H4P; Calnexin: 钙连蛋白的腔室域, PDB号1JHN; BiP: 结合蛋白, PDB号3QFU; PDI: 蛋白二硫键异构酶, PDB号2B5E; PPIase: 肽基脯氨酰异构酶, PDB号4BF8; ER mannosidase I: 内质网甘露糖苷酶I, PDB号1X9D; EDEM: 内质网内增强降解甘露糖苷酶样蛋白; Ubiquitin: 泛素, PDB号2JZZ; Hrd复合物: 协助错误折叠蛋白运出内质网的蛋白复合物, PDB号1C4Z; OS9: PDB号3AIH; p97: PDB号1R7R; 20S蛋白酶体核心(20S Proteasome), PDB号4R3O; Derlin: 泛素连接酶. (b) 黑曲霉与酿酒酵母PDI蛋白的结构比对。黑曲霉的PDI蛋白结构是建模得到的, 酿酒酵母的PDI蛋白PDB号为2B5E. (c) OS9蛋白对于底物α-1,6-甘露糖的识别. (d) OS9蛋白与底物相互作用的氨基酸<sup>[30]</sup>. (e) 3种丝状真菌与酿酒酵母OS9蛋白的序列比对.

中的关键氨基酸: 第一个甘露糖残基的 O2、O3 与 O4 羟基可与活性架构中的谷氨酰胺(Q)、精氨酸(R)、谷氨酸(E)和酪氨酸(Y)形成氢键网络, 而精氨酸与 O2 羟基形成强氢键, 另外谷氨酰胺和谷氨酸也与 O2 羟基形成氢键, 这可能是 MRH 结构域识别甘露糖残基的结构基础. 2 个色氨酸(W)残基通过形成氢键和  $\pi$ -H 作用力与第二个甘露糖相互作用, 尤其是第一个色氨酸(W)残基与第二个甘露糖残基的 O2、O5 羟基及其  $\alpha$ -1, 6-糖苷键的 O 原子形成氢键, 这对 OS9-MRH 结构域与聚糖的特异性结合也发挥重要作用<sup>[50]</sup>(图 3d). 对于构巢曲霉(*A. nidulans*)<sup>[31]</sup>、孢子丝菌(*S. brasiliensis*)<sup>[51]</sup>、粗糙脉孢菌(*N. crassa*)<sup>[52]</sup>和酿酒酵母菌(*S. cerevisiae*)<sup>[53]</sup>的 OS9 蛋白进行序列比对(图 3e)发现: 与底物第一个甘露糖残基形成氢键的 173 位谷氨酰胺(Q)、252 位精氨酸(R)、273 位谷氨酸(E)和 279 位酪氨酸(Y)在 3 种丝状真菌与酵母菌中都是高度保守的; 不同的是, 丝状真菌中与第二个甘露糖相互作用的残基是 2 个色氨酸(160 位和 161 位 W), 而酵母菌中是苯丙氨酸(F)和色氨酸(W), 苯丙氨酸对于色氨酸的替换不影响 OS9 蛋白对于甘露糖的结合, 但使得 OS9 蛋白与后续蛋白的结合力减弱<sup>[54]</sup>, 不利于降解途径的进行. 因此, 定位并解析参与降解系统中特定蛋白结构的关键氨基酸, 了解其对底物特异性识别与结合的影响, 将对剖析丝状真菌中错误折叠蛋白的高效识别与降解机制有所裨益.

#### 4 胞外蛋白分泌的特征步骤: 膜泡运输

分泌蛋白在内质网内经过折叠与糖基化修饰之后, 通过膜泡运输转运至高尔基体进行再加工, 最后分泌到细胞膜外. 在整个过程中, 借助于细胞骨架的定向作用, 膜泡将相关蛋白转运至目的地, 并与靶膜融合, 释放其内含物到高尔基体基质或细胞膜外<sup>[55]</sup>(图 4a). 膜泡运输的完成需要多种不同类型和功能的有被小泡的介导(图 1c). 在蛋白分泌过程中, 发挥主要作用的有被小泡是 COP II、COP I 和网格蛋白(calnexin)<sup>[56]</sup>. COP II(图 1c- 红色膜泡)主要介导蛋白从内质网到高尔基体的顺向运输, 而 COP I(图 1c- 蓝色膜泡)介导分泌蛋白从高尔基体反面膜囊到顺面膜囊以及从高尔基体到内质网的逆向运输, 网格蛋白(图 1c- 绿色膜泡)则介导蛋白从高尔基体到细胞膜运输. 三种小泡都需要 GTP 结合蛋白(Sar 与 ARF)的协助, 在瑞氏木霉与黑曲霉

中均检测到 Sar<sup>[57]</sup>的同源蛋白, 由此推测丝状真菌中也存在膜泡运输的相关途径.

膜泡运输最关键的步骤是相关有被小泡与靶膜的特异性融合, 该过程主要受 SNARE(可溶的 N-乙酰马来酰亚胺敏感因子关联蛋白受体)蛋白的介导. 转运膜泡上都有特定的 v-SNARE, 可识别靶膜上的 t-SNARE 并与之特异性结合<sup>[58]</sup>. 丝状真菌蛋白质组分析也鉴定出参与膜泡融合蛋白, 如属于 v-SNARE 的 SNC1 及属于 t-SNARE 的 SSO1 和 SSO2 等<sup>[18]</sup>. SNARE 蛋白主要由七肽重复序列构成, 在膜上组装时会形成高度稳定的  $\alpha$  螺旋结构<sup>[59-60]</sup>. 螺旋内的氨基酸支链是高度疏水的, 并与螺旋轴垂直分布. 当 SNARE 互补成分分别组装在膜泡和靶膜上, 即膜泡上的 v-SNARE 和靶膜上的 t-SNARE 时, 两者会克服分子之间的斥力使膜融合<sup>[59, 61]</sup>. 从表面电势来看, 两种蛋白是依靠电荷的互补进行结合的(图 4b), 具体来说, 就是 v-SNARE<sup>[62]</sup>上的精氨酸(R)、谷氨酸(E)和天冬氨酸(D)分别与 t-SNARE<sup>[63]</sup>上的谷氨酸(E)、赖氨酸(K)和精氨酸(R)形成离子键(图 4c). 将粗糙脉孢菌(*N. crassa*)<sup>[62]</sup>、米曲霉(*A. oryzae*)<sup>[64]</sup>、红褐肉座菌(*H. jecorina*)<sup>[11]</sup>与酿酒酵母菌(*S. cerevisiae*)<sup>[53]</sup>的 SNARE 蛋白进行序列比对, v-SNARE 的蛋白序列(图 4d)在三种丝状真菌和酵母菌中具有相似点, 即两者都有一些相同的保守氨基酸: 极性氨基酸——苏氨酸(T)用于形成分子内氢键以稳定螺旋结构, 酸性氨基酸——天冬氨酸(D)与 t-SNARE 的碱性氨基酸形成离子键以及疏水性氨基酸——苯丙氨酸(F)、亮氨酸(L)和甲硫氨酸(M)形成螺旋的疏水内部, 而不同之处在于: 191 位氨基酸在丝状真菌中是精氨酸(R), 在酵母菌中则是不利于分子间离子键形成的疏水性氨基酸. 此外, 丝状真菌中 116 位和 162 位的脯氨酸(P)和亮氨酸(L)在酵母菌中都为易造成空间位阻的苯丙氨酸(F), 因此不利于螺旋的形成. 这可能是丝状真菌蛋白分泌能力高于酵母菌的原因之一. 如图 4e 所示, t-SNARE 的序列比对发现, 三种丝状真菌与酵母菌具有一些相同的保守氨基酸, 其中谷氨酸(E)用于与 v-SNARE 的碱性氨基酸相互作用、亮氨酸(L)与谷氨酰胺(Q)形成螺旋内部、碱性赖氨酸(K)与 v-SNARE 的酸性氨基酸相互作用, 不同之处是丝状真菌 239 位、300 位和 306 位的精氨酸(R)和赖氨酸(K)在酵母菌中为非碱性氨基酸, 不利于与 v-SNARE 的酸性氨基酸形成离子键, 这可能也是

导致丝状真菌比酵母菌蛋白分泌高效的原因。显然，通过对相关膜融合蛋白的序列比对和空间互补性分析，可以预测丝状真菌膜泡高效融合的方式，

而相关预测的高通量实验验证将是下一步努力的方向。

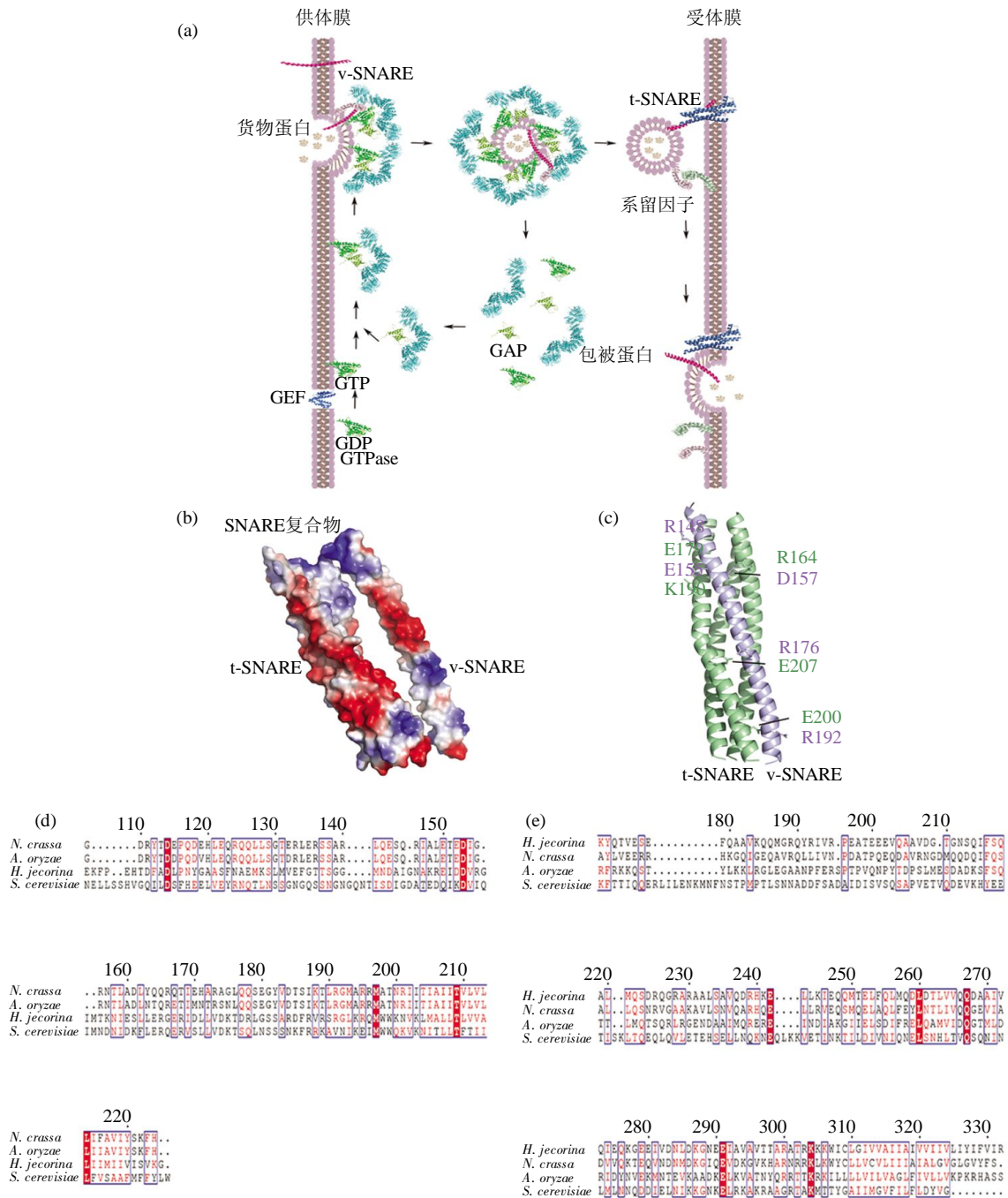


Fig. 4 Vesicular transport

图 4 膜泡运输

(a) 膜泡运输的过程<sup>[6]</sup>。参与膜泡运输的蛋白：GTPase(GTP 酶)，PDB 号 2F9M；GEF，鸟苷酸交换因子，PDB 号 1GZS；包被蛋白(Coat)，PDB 号 3MZK；GAP，GTP 酶激活蛋白，PDB 号 2DA0；系留因子(Tether)，PDB 号 3GRL；v-SNARE，v-SNARE 受体，PDB 号 1GL2；t-SNARE，t-SNARE 受体，PDB 号 1FIO。(b) SNARE 复合体的表面电势展示。红色代表带负电，蓝色代表带正电，白色代表电中性。此蛋白 PDB 号 1GL2。(c) SNARE 复合体相互作用的关键氨基酸<sup>[9]</sup>。红色标记代表 v-SNARE 的关键氨基酸，绿色标记代表 t-SNARE 的关键氨基酸。(d) 3 种丝状真菌与酿酒酵母菌的 v-SNARE 蛋白的序列比对。(e) 3 种丝状真菌与酿酒酵母菌的 t-SNARE 蛋白的序列比对。

## 5 展 望

丝状真菌具有强大的分泌系统: 分泌至胞外的蛋白, 从多肽合成位置经过一系列关键蛋白的特异性高效识别、结合转运、加工与修饰, 最终经膜泡运输转运至胞外. 在这个过程中, 主要是多肽靶向内质网时信号识别颗粒(SRP)对于信号序列的高效识别以及信号识别颗粒(SRP)和受体(SR)的高度协同, 多肽在内质网中经钙连蛋白/钙网蛋白及PDI等的帮助进行高效的正确折叠、修饰及形成正确的二硫键, 内质网中错误折叠蛋白的高效识别及转运至蛋白酶体降解, 如OS9蛋白对于错误折叠糖蛋白的快速识别及介导, 最后在SNARE蛋白介导膜泡与靶膜的快速融合等帮助下将正确折叠的蛋白高效运输至胞外, 形成高效功能酶系统.

本综述通过对丝状真菌和其他真核生物参与分泌途径的关键蛋白进行序列和结构比对分析, 推测了其关键蛋白相比其他真核生物具有更高效的识别与结合效率, 在一定程度上揭示了丝状真菌高效分泌的可能机制. 近年来, 随着测序技术的快速发展, 海量序列与结构数据的快速积累, 建立高效的结构生物信息学分析与预测平台, 深入分析参与分泌途径的相关蛋白的结构、性质以及蛋白质之间的构效关系, 对于全面预测分析与认识丝状真菌胞外蛋白的高效分泌效率将具有重要的意义. 同时, 相关机理的阐明将会大大推动工业生物技术与相关产业的快速发展.

## 参 考 文 献

- [1] 曲音波. 木质纤维素降解酶与生物炼制. 北京: 化学工业出版社, 2011  
Qu Y B. Lignocellulose degrading enzymes and biofinery. Beijing: Chemical Industry Press, 2011
- [2] Himmel M. 生物质抗降解屏障 - 解构植物细胞壁产生生物能. 北京: 化学工业出版社, 2010  
Himmel M. Biomass degradation resistance barrier to deconstruct the cell walls of plant biomass production. Beijing: Chemical Industry Press, 2010
- [3] Riquelme M, Sánchez-León E. The Spitzenkörper: a choreographer of fungal growth and morphogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 2014, **20**: 27-33
- [4] Kubicek C P, Mikus M, Schuster A, *et al.* Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnol Biofuels*, 2009, **2**(1): 19-32
- [5] Ward O P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, 2012, **30**(5): 1119-1139
- [6] Idiris A, Tohda H, Kumagai H, *et al.* Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, **86**(2): 403-417
- [7] Zhang Q, Zhang X, Wang P, *et al.* Determination of the action modes of cellulases from hydrolytic profiles over a time course using fluorescence-assisted carbohydrate electrophoresis. *Electrophoresis*, 2015, **36**(6): 910-917
- [8] 刘国栋. 木质纤维素降解真菌斜卧青霉的比较基因组学与功能基因组学研究. 山东大学, 2012  
Liu G D. Comparative and functional genomics studies of lignocellulolytic fungus *Penicillium decumbens*. Shandong University, 2012
- [9] 张小梅, 李单单, 王禄山, 等. 纤维素酶家族及其催化结构域分子改造的新进展. *生物工程学报*, 2013, **29**(4): 422-433  
Zhang X M, Li D D, Wang L S, *et al.* *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, **29**(4): 422-433
- [10] 孟凡辉, 蒋绪恺, 刘琳, 等. 纤维素酶解速度的可视化表征与限制因素分析. *生物化学与生物物理进展*, 2015, **42**(3): 201-210  
Meng F H, Jiang X K, Liu L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2015, **42**(3): 201-210
- [11] Martinez D, Berka R M, Henrissat B, *et al.* Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology*, 2008, **26**(5): 553-560
- [12] Xing S, Li G, Sun X, *et al.* Dynamic changes in xylanases and  $\beta$ -1, 4-endoglucanases secreted by *Aspergillus niger* An-76 in response to hydrolysates of lignocellulose polysaccharide. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, **171**(4): 832-846
- [13] Pel H J, De Winde J H, Archer D B, *et al.* Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*, 2007, **25**(2): 221-231.
- [14] Machida M, Asai K, Sano M, *et al.* Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 2005, **438** (7071): 1157-1161
- [15] Steinberg G. Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper. *Eukaryotic Cell*, 2007, **6**(3): 351-360
- [16] Talabardon M, Yang S T. Production of GFP and glucoamylase by recombinant *Aspergillus niger*: effects of fermentation conditions on fungal morphology and protein secretion. *Biotechnology Progress*, 2005, **21**(5): 1389-1400
- [17] Riquelme M, Bredeweg E L, Callejas-Negrete O, *et al.* The *Neurospora crassa* exocyst complex tethers Spitzenkörper vesicles to the apical plasma membrane during polarized growth. *Molecular Biology of The Cell*, 2014, **25**(8): 1312-1326
- [18] Saloheimo M, Pakula T M. The cargo and the transport system: secreted proteins and protein secretion in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). *Microbiology*, 2012, **158**(1): 46-57
- [19] Thompson S A, Golightly E J, Yaver D S. Nucleotide sequence of the *Aspergillus niger* *srpA* gene. *Gene*, 1995, **167**(1): 337-338
- [20] Sims A H, Gent M E, Lanthaler K, *et al.* Transcriptome analysis of recombinant protein secretion by *Aspergillus nidulans* and the



- unfolded-protein response *in vivo*. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**(5): 2737–2747
- [21] Hainzl T, Huang S, Meriläinen G, *et al.* Structural basis of signal-sequence recognition by the signal recognition particle. Nature Structural & Molecular Biology, 2011, **18**(3): 389–391
- [22] Keenan R J, Freymann D M, Walter P, *et al.* Crystal structure of the signal sequence binding subunit of the signal recognition particle. Cell, 1998, **94**(2): 181–191
- [23] Halic M, Gartmann M, Schlenker O, *et al.* Signal recognition particle receptor exposes the ribosomal translocon binding site. Science, 2006, **312**(5774): 745–747
- [24] Halic M, Blau M, Becker T, *et al.* Following the signal sequence from ribosomal tunnel exit to signal recognition particle. Nature, 2006, **444**(7118): 507–511
- [25] Zhang C, Marcia M, Langer J D, *et al.* Role of the N-terminal signal peptide in the membrane insertion of *Aquifex aeolicus* F1F0 ATP synthase c-subunit. FEBS Journal, 2013, **280**(14): 3425–3435
- [26] Nilsson I, Lara P, Hessa T, *et al.* The code for directing proteins for translocation across ER membrane: SRP cotranslationally recognizes specific features of a signal sequence. Journal of Molecular Biology, 2015, **427**(6): 1191–1201
- [27] Wood V, Gwilliam R, Rajandream M-A, *et al.* The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. Nature, 2002, **415**(6874): 871–880
- [28] Conesa A, Punt P J, Van Luijk N, *et al.* The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. Fungal Genetics and Biology, 2001, **33**(3): 155–171
- [29] Roche C M, Loros J J, McCluskey K, *et al.* *Neurospora crassa*: Looking back and looking forward at a model microbe. American Journal of Botany, 2014, **101**(12): 2022–2035
- [30] Tremmel D, Duarte M, Videira A, *et al.* FKBP22 is part of chaperone/folding catalyst complexes in the endoplasmic reticulum of *Neurospora crassa*. FEBS Letters, 2007, **581**(10): 2036–2040
- [31] Wortman J R, Gilson J M, Joardar V, *et al.* The 2008 update of the *Aspergillus nidulans* genome annotation: a community effort. Fungal Genetics and Biology, 2009, **46**(1): S2–S13
- [32] Sibthorp C, Wu H, Cowley G, *et al.* Transcriptome analysis of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* directed to the global identification of promoters. BMC Genomics, 2013, **14**(1): 847–864
- [33] Ngiam C, Jeenes D J, Punt P J, *et al.* Characterization of a foldase, protein disulfide isomerase A, in the protein secretory pathway of *Aspergillus niger*. Applied and Environmental Microbiology, 2000, **66**(2): 775–782
- [34] Derckx P, Madrid S. The foldase CYPB is a component of the secretory pathway of *Aspergillus niger* and contains the endoplasmic reticulum retention signal HEEL. Molecular Genetics and Genomics, 2001, **266**(4): 537–545
- [35] Wang H, Entwistle J, Morlon E, *et al.* Isolation and characterisation of a calnexin homologue, clxA, from *Aspergillus niger*. Molecular Genetics and Genomics, 2003, **268**(5): 684–691
- [36] Saloheimo M, Lund M, Penttilä M. The protein disulphide isomerase gene of the fungus *Trichoderma reesei* is induced by endoplasmic reticulum stress and regulated by the carbon source. Molecular and General Genetics MGG, 1999, **262**(1): 35–45
- [37] Nigam S, Sarma P, Ghosh P, *et al.* Characterization of *Aspergillus fumigatus* protein disulfide isomerase family gene. Gene, 2001, **281**(1): 143–150
- [38] Lee B R, Yamada O, Kitamoto K, *et al.* Cloning, characterization and overexpression of a gene (pdiA) encoding protein disulfide isomerase of *Aspergillus oryzae*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1996, **82**(6): 538–543
- [39] Helenius A, Aebi M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. Annual Review of Biochemistry, 2004, **73**(1): 1019–1049
- [40] Lovat P E, Corazzari M, Armstrong J L, *et al.* Increasing melanoma cell death using inhibitors of protein disulfide isomerases to abrogate survival responses to endoplasmic reticulum stress. Cancer Research, 2008, **68**(13): 5363–5369
- [41] Muller C, Bandemer J, Vindis C, *et al.* Protein disulfide isomerase modification and inhibition contribute to ER stress and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins. Antioxidants & Redox Signaling, 2013, **18**(7): 731–742
- [42] Serve O, Kamiya Y, Maeno A, *et al.* Redox-dependent domain rearrangement of protein disulfide isomerase coupled with exposure of its substrate-binding hydrophobic surface. Journal of Molecular Biology, 2010, **396**(2): 361–374
- [43] Inagaki K, Satoh T, Itoh S G, *et al.* Redox-dependent conformational transition of catalytic domain of protein disulfide isomerase indicated by crystal structure-based molecular dynamics simulation. Chemical Physics Letters, 2015, **618**: 203–207
- [44] Tian G, Xiang S, Noiva R, *et al.* The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites. Cell, 2006, **124**(1): 61–73
- [45] Bernasconi R, Molinari M. ERAD and ERAD tuning: disposal of cargo and of ERAD regulators from the mammalian ER. Current Opinion in Cell Biology, 2011, **23**(2): 176–183
- [46] Sunryd J C, Tannous A, Lamriben L, *et al.* Chaperones of the Endoplasmic Reticulum Associated Degradation (ERAD) Pathway. The Molecular Chaperones Interaction Networks in Protein Folding and Degradation. Springer. 2014: 273–302
- [47] Smith M H, Ploegh H L, Weissman J S. Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. Science, 2011, **334**(6059): 1086–1090
- [48] Colabardini A C, De Castro P A, De Gouvêa P F, *et al.* Involvement of the *Aspergillus nidulans* protein kinase C with farnesol tolerance is related to the unfolded protein response. Molecular Microbiology, 2010, **78**(5): 1259–1279
- [49] Carvalho N D, Arentshorst M, Kooistra R, *et al.* Effects of a defective ERAD pathway on growth and heterologous protein production in *Aspergillus niger*. Applied Microbiology and

- Biotechnology, 2011, **89**(2): 357–373
- [50] Satoh T, Chen Y, Hu D, *et al.* Structural basis for oligosaccharide recognition of misfolded glycoproteins by OS-9 in ER-associated degradation. *Molecular Cell*, 2010, **40**(6): 905–916
- [51] Teixeira M M, De Almeida L G, Kubitschek-Barreira P, *et al.* Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *BMC Genomics*, 2014, **15**(1): 943–964
- [52] Galagan J E, Calvo S E, Borkovich K A, *et al.* The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 2003, **422**(6934): 859–868
- [53] Engel S R, Dietrich F S, Fisk D G, *et al.* The reference genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: then and now. *G3: Genes Genomes Genetics*, 2014, **4**(3): 389–398
- [54] Bernasconi R, Galli C, Noack J, *et al.* Role of the SEL1L: LC3-I complex as an ERAD tuning receptor in the mammalian ER. *Molecular Cell*, 2012, **46**(6): 809–819
- [55] Spang A. Membrane traffic in the secretory pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, **65**(18): 2781–2789
- [56] Bonifacino J S, Glick B S. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, 2004, **116**(2): 153–166
- [57] Veldhuisen G, Saloheimo M, Fiers M, *et al.* Isolation and analysis of functional homologues of the secretion-related SAR1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* from *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. *Molecular and General Genetics MGG*, 1997, **256** (4): 446–455
- [58] Söllner T, Whiteheart S W, Brunner M, *et al.* SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, 1993, **362**(6418): 318–324
- [59] Antonin W, Fasshauer D, Becker S, *et al.* Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2002, **9**(2): 107–111
- [60] Vivona S, Cipriano D J, Leary S O, *et al.* A conserved, 1:1 interaction between  $\alpha$ -SNAP and t-SNAREs initiates disassembly of all SNARE complexes by the N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF). *Journal of Biological Chemistry*, 2013, jbc. M113. 489807
- [61] Zhao M, Wu S, Zhou Q, *et al.* Mechanistic insights into the recycling machine of the SNARE complex. *Nature*, 2015, **518**(7537): 61–67
- [62] Walter A M, Kurps J, De Wit H, *et al.* The SNARE protein vti1a functions in dense-core vesicle biogenesis. *The EMBO Journal*, 2014, **33**(15): 1681–1697
- [63] Rizo J, Südhof T C. The membrane fusion enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 proteins, and their accomplices-guilty as charged? *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2012, **28**: 279–308
- [64] Umemura M, Koyama Y, Takeda I, *et al.* Fine *de novo* sequencing of a fungal genome using only SOLiD short read data: verification on *Aspergillus oryzae* RIB40. *PLoS One*, 2013, **8**(5): e63673
- [65] Bonifacino J S. Vesicular transport earns a Nobel. *Trends in Cell Biology*, 2014, **24**(1): 3–5

## Research Progress on The Efficient Secretion Mechanism of Extracellular Proteins in Filamentous Fungi\*

ZHOU Na-Na, WANG Lu-Shan, GONG Wei-Li, ZHAO Yue, ZHANG Huai-Qiang\*\*

(The State Key Laboratory of Microbiol Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

**Abstract** Filamentous fungi are efficient cell factories in producing industrial enzyme products as the efficiency in extracellular proteins secretion. Most researches on extracellular proteins secretion in new century found that the protein secretion pathway of filamentous fungi had an efficient secretion mechanism compared with other eukaryotes'. In order to explore the efficient mechanism, this paper summarized the latest research progresses of secretory pathway in filamentous fungi. The key proteins in the secretory pathway were selected to perform sequence alignment and structure alignment. And the possible efficient secretion mechanism was put forward.

**Key words** filamentous fungi, apocrine secretion, efficient secretion mechanism, sequence alignment, structure alignment

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2015.0233

---

\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31370111, 31170071) and The Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2013CM038).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-15253169279, E-mail: zhq@sdu.edu.cn

Received: November 8, 2015 Accepted: December 9, 2015