COP9信号小体亚基CsnE对无花果拟盘多毛孢生长发育和次级代谢的影响

郑艳静^{1,2}, 王秀娜³, 章小灵², 李伟², 刘钢², 汪世华³, 阎秀峰¹, 邹慧熙^{1*}, 尹文兵^{2,4*}

1. 温州大学生命与环境科学学院, 浙江省水环境与海洋生物资源保护重点实验, 温州 325035;

2. 中国科学院微生物研究所, 真菌学国家重点实验室, 北京 100101;

3. 福建农林大学生命科学学院, 福州 350002;

4. 中国科学院大学生命科学院, 北京 100049

* 联系人, E-mail: zjuzhx@wzu.edu.cn; yinwb@im.ac.cn

收稿日期: 2017-04-26; 接受日期: 2017-05-06; 网络版发表日期: 2017-07-12

国家“十三五”重点研发专项(批准号: 2016YFD0400105)、国家自然科学基金(批准号: 31670402, 31400334)和真菌学国家重点实验室开放课题(批准号: SKLMKF 2015-1)资助

摘要 COP9信号小体, 又称CSN, 是一个多亚基蛋白复合物, 在所有真核生物体中高度保守, 调控着多个重要的生物学过程. 研究证明, CSN复合体的第5个亚基CsnE调控丝状真菌的生长发育和次级代谢. 本研究以植物内生真菌无花果拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis fici*)为研究对象, 揭示了CsnE对孢子形成及次级代谢的调控作用. 根据构巢曲霉中CsnE蛋白的氨基酸序列, 利用BLAST进行比对, 在无花果拟盘多毛孢基因组中找到与其同源的序列PfCsnE. *PfcsnE*基因的缺失突变株(Δ *PfcsnE*)不再产生孢子, 而回补*PfcsnE*基因, 孢子恢复产生, 这表明PfCsnE对*P. fici*孢子的形成是必不可少的. 对次级代谢产物进行分析发现, 与野生型菌株(WT)相比, Δ *PfcsnE*菌株chloroisosulochrin产量增加, 而ficiolide A产量减少. 对WT和 Δ *PfcsnE*菌株进行转录组分析发现, PfCsnE影响了8.37%的基因的表达. 其中, 在 Δ *PfcsnE*菌株中涉及孢子形成的多个基因表达量下降, 此外, 9个次级代谢生物合成基因簇表达量上升, 3个下降. 综上所述, PfCsnE对*P. fici*孢子形成及次级代谢起到非常重要的调控作用.

关键词 COP9信号小体, CSN, 次级代谢, 孢子发育, 内生真菌

COP9信号小体(COP9 signalosome), 即CSN复合体, 是真核生物中高度保守的多蛋白复合体^[1-3]. 该复合体由8个亚基(CSN1~CSN8)组成^[1], 最早在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中发现, 是拟南芥光形态发生的重要的调控基因^[4,5]. CSN可以调控多个重要的生物学过程, 如泛素-蛋白酶体降解途径, DNA损伤应答以及基因表达. 因此, CSN缺陷会导致植物幼苗和动物早

期胚胎死亡^[2-4]. 此外, CSN与人类肿瘤细胞的形成有关^[6]. CSN的活性中心位于第5个亚基, 该亚基含有金属酶蛋白, 调节cullin-RING泛素连接酶(CRLs)的活性. 据报道, Csn5含有JAMM结构域, 可以使与泛素化相关的蛋白NEDD8从Cullin上分离^[7]. 因此, Csn5/CsnE是CSN复合体的关键亚基.

在真菌中, Csn5蛋白最早发现于粟酒裂殖酵母

引用格式: 郑艳静, 王秀娜, 章小灵, 等. COP9信号小体亚基CsnE对无花果拟盘多毛孢生长发育和次级代谢的影响. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 750-758, doi: [10.1360/N052017-00122](https://doi.org/10.1360/N052017-00122)

英文版见: Zheng Y J, Wang X N, Zhang X L, et al. COP9 signalosome subunit PfCsnE regulates secondary metabolism and conidial formation in *Pestalotiopsis fici*. Sci China Life Sci, 2017, in press, doi: [10.1007/s11427-017-9068-4](https://doi.org/10.1007/s11427-017-9068-4)

(*Schizosaccharomyces pombe*)中^[8]. 有趣的是, 敲除粟酒裂殖酵母的*csn5*没有引起明显的表型变化^[8,9]. 随后, 在构巢曲霉中(*Aspergillus nidulans*)发现了Csn5的同源蛋白CsnE. CsnE通常与第4个亚基CsnD结合后发挥功能^[10]. 构巢曲霉中CsnD/CsnE复合物是一个重要的调控因子, 可以参与调控细胞周期, DNA损伤应答以及生长发育^[11,12]. 构巢曲霉的 $\Delta csnE$ 突变株与 $\Delta csnD$ 突变株表型变化一致, 并且在培养基上出现的红色物质, 表明CsnD/CsnE即能调控构巢曲霉的生长发育, 也影响次级代谢^[11].

CsnE如何调控真菌的生长发育是一个非常有趣的问题, 研究者尝试通过转录组分析基因的表达状况对此进行解释. 从转录组数据上分析, 构巢曲霉*csnE*基因的缺失突变株中15%的基因表达都受到影响, 其中就包括与无性孢子形成相关的多个基因. 这导致构巢曲霉的蛋白水平发生变化, 从而使氧化还原调节受损, 对氧化应激反应也更为敏感^[13]. 从结构上分析, CsnE亚基的MNP结构域中含有JAMM, 可以控制多细胞生物体的生长发育, 如影响真菌子实体的形成. CsnE是与DEN1/DenA相互影响来催化蛋白质降解^[14-16].

近年来, 一些研究报道了CsnE在调控丝状真菌生长发育的同时也伴随调控次级代谢^[17,18]. 考虑到真菌*csnE*基因缺失突变株表型的明显变化, 通过控制一些调控真菌的生长发育的基因, 可能会导致新颖的活性天然产物的发现, 这也将是挖掘真菌天然产物的一种新的策略. 敲除构巢曲霉中的*csnE*基

因, 一个沉默聚酮合酶(polyketone synthase, PKS)基因簇被激活, 在次级代谢产物中鉴定了一个新结构类型的抗菌素DHMBA(2,4-dihydroxy-3-methyl-6-(2-oxo-propyl) benzaldehyde)^[18]. 到目前为止, 植物内生真菌中同时调控生长发育及次级代谢的调控因子被鉴定的还比较少. 其中之一是bZIP型转录因子PfZipA, 可以调控*P. fici*的次级代谢和应激反应^[19]. 敲除*PfzipA*, *P. fici*表现出对抗氧化应激环境的耐受表型. 受氧化胁迫时, 突变株的次级代谢产物也发生相应的变化^[19]. 此外, 从组氨酸甲基转移酶PfCclA及去乙酰化酶PfHdaA基因敲除的*P. fici*突变株中分离得到了15个新化合物^[20]. 而上述这些表观遗传调控因子并没有影响真菌的形态发育.

本研究在*P. fici*中找到CsnE的同源蛋白PfCsnE. 敲除*PfcsnE*基因, 突变株的无性发育阶段严重受阻, 不再产生分生孢子. 分析WT和 $\Delta PfcsnE$ 菌株的次级代谢产物, 发现有很大的变化. 这表明, PfCsnE对调控*P. fici*的次级代谢和生长发育均起到至关重要的作用. 结合转录组分析也发现, PfCsnE影响*P. fici*基因组中与生长发育和次级代谢相关基因的表达. 研究结果为PfCsnE对植物内生真菌次级代谢和孢子发育的调控作用提供了更为深刻的见解.

1 材料方法

1.1 菌株、培养基及培养条件

本研究所用的菌株及质粒均列于表1.

表 1 本研究所用的菌株和质粒^{a)}

Strain/plasmid	Description	Reference
<i>Pestalotiopsis fici</i> CGMCC3.15140	Wild type	[21]
AGL-1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain	[22]
TYXW9.1	$\Delta PfcsnE::hph$	This study
TYJ3.1	$\Delta PfcsnE::hph, promoter-PfcsnE-terminator::G418$	This study
pAG1-H3	binary donor vectors pAg1-H3	[23]
pXW06	yeast recombination vector	[24]
pYXW19.1	PFICI_12631 deletion cassette in pXW06	This study
pYXW27	PFICI_12631 deletion cassette in pAG1-H3	This study
pYWL42	<i>G418</i> in pEasy-Blunt	This study
pYYJ4	<i>promoter-PfcsnE-terminator</i> in pYWL42	This study
pAG1-H3-G418	<i>G418</i> in pAG1-H3	This study

a) pXX: plasmid; TXX: original transformant

P. fici 及其突变株用PDA(potato dextrose agar)或PDB(potato dextrose broth)培养基培养, 根据需要加相应的抗生素, 培养温度为25℃. 大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)AGL-1用含有相应抗生素LB培养基培养, 用于质粒DNA的提取. 用于酵母组装的酵母菌株(*Saccharomyces cerevisiae*)BJ5464-NpgA (*MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-Δ1 trp1 pep4::HIS3 prb1Δ1.6R can1 GAL*)生长在YPD(yeast extract peptone dextrose)培养基上. 转化后的酵母菌落用合成葡萄糖完全培养基SDCt(synthetic dextrose complete medium)进行筛选, 添加相应的营养缺陷元素^[25].

1.2 基因克隆及质粒构建

PCR所用引物的核苷酸序列在表2中列出, 扩增

所用的酶为TransStart® FastPfu DNA聚合酶(Transgene Biotech, 北京). PCR仪为Bio-Rad公司的T100™ Thermal cycler. 参考之前的方法提取*P. fici*基因组DNA^[22].

通过两步操作来构建*PfcsnE*基因的敲除载体. 首先, 利用酵母组装的策略构建敲除元件^[25]. 以pDHt-hyg(表1)载体为模板扩增标记基因潮霉素B; 以*P. fici*基因组为模板, 用设计好的引物(表2)分别扩增目标基因开放阅读框上下游约1kb的DNA序列作为同源臂. 将3个片段与线性化的载体pXW06(表1)进行纯化(EasyPure® Quick Gel Extraction Kit(Transgene Biotech))后定量, 同时转入酵母感受态细胞进行组装, 获得质粒pYXW19.1. 然后, 用限制性内切酶*Kpn* I -*Pac* I 酶切质粒pYXW19.1, 回收敲除元件片段, 将其插入到pAG1-H3中, 获得新的载体pYXW27(表1), 用于农杆菌转化. 构建回补载体时, 同样以*P. fici*基因组为模板, 用

表2 本研究中所用的引物核苷酸序列

Name	Oligonucleotide sequence (5'→3')	Uses
12631RT_F	CCTTGCTCGCATACTTAG	PFICI_12631 transformant screening
12631RT_R	GGAAGGGCTCTTGAAC	
K12631_5f_F	ACTATCAACTATTAAGTATATCGTAATACCATCATAGATAC- CGTAGTATGCGTGC	5 flanks amplification
K12631_5f_R	CCTTCAATATCATCTTCTGTCGACCTCGAGGGGTAATG- GTGAATGTTGGAGG	
K12631_3f_F	CGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCGCAATCAT- GCAGGCGGTTATG	3 flanks amplification
K12631_3f_R	ACTTGATAATGGAACTATAAATCGTGAAGGCATGTTTGC- CGTTCTTCTTGATGGAG	
12631_5f_EF	ACTTGAAGCCACCCGTAA	<i>PfcsnE</i> transformant 5F screening
12631T_R	ATCGGCGCAGCTATTAC	
12631T_F	GTCCAAGCAGCAAAGAG	<i>PfcsnE</i> transformant 3F screening
12631_3f_ER	CATACCGCAACAAAGGG	
hyg_f	CCTCGAGGTCGACAGAAGATGATATTGAAGGGCGCAATTAACCTCACTA	Hygromycin B amplification
hyg_r	CGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGCAGGGCTGGTGACGGAAT	
G418-F	GATATCTCTAGATTAAACGCTTACAATTTCC	G418 amplification
G418-R	GTCGACTCTAGAGAATAGGAAGCTTC	
12631-PT-F	GCTCGGATCCGTGGTAGGTCGCTCTGGACA	Amplification of the gene from promoter and terminator
12631-PT-R	CCGTTACTAGTCCAGCGAATCTTCGCTCTG	
12631Q-F	CGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCGTGGTAGGTCGCTCTGGACA	Verification of complementary transformant
12631Q-R	CAATTCAGCACACTGGCGGCCGTACTAGTCCAGCGAATCTTCGCTCTG	

设计好的引物扩增包括*PfcsnE*基因的编码区以及上游1kb启动子和下游0.5kb的终止子的序列. 用酶切连接的方法将纯化回收后的片段插入到pYWL42 (pEasy-Blunt-G418)载体的*Bam*H I -*Spe* I 位点, 获得载体pYYJ4(表1), 用于原生质体转化. 构建pYWL42使用的标记基因*G418*是以pAG1-H3-G418为模板, 用设计好的引物进行扩增, 纯化后插入pEasy-Blunt Cloning Vector (TransGen Biotech)的*Eco*R V -*Sal* I 位点. 所有载体都用酶切连接的方法进行验证.

1.3 Δ *PfCsnE*菌株及回补菌株的构建

利用农杆菌介导的真菌转化法^[25], 构建基因缺失突变株. 将质粒pYXW27转化到*A. tumefaciens* AGL-1菌株中, 用含有Hygromycin B的PDA筛选转化子. 提取基因组DNA, 用设计好的引物(表2)验证转化子. 在突变株 Δ *PfcsnE*的基础上构建回补菌株, 将回补质粒pYYJ4转到 Δ *PfcsnE*菌株的原生质体中, 通过含G418的PDA培养基来筛选转化子. 同样提取基因组DNA, 用设计好的引物(表2)验证回补菌株的转化子^[20].

1.4 WT, Δ *PfCsnE*和 Δ *PfCsnE*^C菌株的形态观察

WT, Δ *PfCsnE*和 Δ *PfCsnE*^C菌株分别接种在PDA培养基上, 置于光照和黑暗条件下, 25℃培养7天, 并于第5天时测量菌落的直径.

1.5 HPLC分析次级代谢产物

WT, Δ *PfCsnE*和 Δ *PfCsnE*^C菌株在等量的PDA培养基上, 25℃培养7天. 将培养基同菌丝一起切碎, 转移至100mL的三角瓶中, 分别加入25mL的MEA(乙酸乙酯: 甲醇: 乙酸=89:10:1), 室温超声1h. 萃取液用旋转蒸发仪蒸干并称重, 溶解于适量的色谱甲醇中至终浓度为5mg/mL. 将样品转移至色谱瓶中进行HPLC分析, 进样量为10 μ L^[19]. HPLC分析仪器采用WATERS 2695, RP C18柱(38020-41 COSMOSIL 5C18-MS-II Packed Column; 4.6mm I.D.×250mm), 流速为1mL/min. 流动相溶剂分别为乙腈(B相), 水(A相), A相中含有0.1%的甲酸. 分析梯度为: 0~30min, 10%B~100%B; 30~35min, 100%B; 35.1min, 10%B; 35.1~40min, 10%B.

化合物1 asperpentyn, 2 ficiolide A, 3 chloroisosulochrin, 4 pestheic acid作为标准品用于HPLC分析. WT和突变株之间化合物产量的变化计算公式为: (Area

(Sample)-Area (Blank))/(Area (WT)-Area (Blank))^[26].

1.6 RNA提取和转录组分析

WT和 Δ *PfCsnE*分别在PDA培养基上培养7天, 收集菌丝, 提取RNA(TRIZOL[®]试剂盒), 每个菌株设置两个生物学重复. RNA样品由北京诺唯赞公司测序, 测序平台为Illumina Hiseq X Ten 平台(2×150bp)paired-end模块. 用HISZT2参考基因组序列对比来读取read数, 用htseq-count计算每个基因比对上了多少reads(生物信息学平台). 使用Cuffmerge程序将每个样本不同的材料合并到gtf文件中, 用于识别差异表达基因(Vazyme生物技术有限公司, 南京). 使用DESeq2来差异表达基因计算, *P*值和Log₂ ratio来表示两个样本表达差异性. Log₂≥3.0和*P*<0.01的基因被认为是表达差异极显著, Log₂≥2.0, *P*<0.01视为的基因被认为是表达差异较显著^[13].

1.7 统计学分析

数据分析用GraphPad软件, Tukey-Kramer多重比较检验, *P*≤0.05, 星号代表差异明显.

2 结果

2.1 *PfcsnE*的鉴定及突变株的构建

在真菌中, 次级代谢产物的生成与生长发育相关. 因此, 研究能同时调控生长发育和次级代谢的调控因子具有非常重要的意义. *CsnE*在真核生物中高度保守, 该基因缺失的真菌突变株, 其次级代谢和生长发育均有不同程度的改变. 因此, 推断在植物内生真菌*P. fici*中也能找到*CsnE*的同源蛋白Pf*CsnE*, 且该蛋白能同时影响*P. fici*生长发育及次级代谢. 根据构巢曲霉的*CsnE*蛋白的氨基酸序列, 利用BLAST在*P. fici*基因组^[19]中找到基因PFICI_12631, 该基因编码的蛋白与*CsnE*的同源性高达59.9%, 在此将该蛋白命名为Pf*CsnE*, 相应的编码基因为*PfcsnE*. 生物信息学表明, *PfcsnE*的可读框(open reading frame, ORF)长1197 bp, 含有一个123 bp的内含子, 编码357个氨基酸组成的蛋白Pf*CsnE*.

为了研究*PfcsnE*基因的功能, 利用分子遗传技术及农杆菌介导的真菌转化方法^[22]构建了*PfcsnE*基因缺失菌株(图1A). 为了进一步确认该基因的功能, 又构建了回补菌株. 提取转化子的基因组DNA, 通过PCR的

方法验证阳性转化子(图1B和C)。

2.2 *PfcsnE*对*P. fici*孢子的发育起至关重要的作用

已有研究表明, CsnE既调控真菌的生长发育又调控次级代谢^[13,18,27]。为了研究*PfcsnE*对*P. fici*生长发育的影响, 将WT, $\Delta PfcsnE$ 和 $\Delta PfcsnE^C$ 菌株接种在PDA培养基上。结果显示, $\Delta PfcsnE$ 菌株不再产生黑色孢子(图2A)。无论是改变培养基, 延长培养时间还是改变光照等条件, 孢子均没有恢复产生, 而回补菌株则恢复

产生孢子。这证明*PfcsnE*基因的缺失严重影响了无性孢子的形成, 导致不再产生分生孢子。此外在第5天测量菌落的生长直径, 结果显示, $\Delta PfcsnE$ 突变株的菌落直径明显小于WT和 $\Delta PfcsnE^C$ 菌株(图2B)。因此, *PfcsnE*基因还影响菌丝的生长速度。

2.3 *PfcsnE*影响*P. fici*次级代谢

真菌的形态变化往往会影响次级代谢^[28], 因此研究了无孢子产生的 $\Delta PfcsnE$ 突变株次级代谢产物。WT,

图1 *PfcsnE*基因缺失突变株及回补菌株的构建

A: 目的基因*PfcsnE*敲除及回补示意图。hph和G418为转化后的筛选标记基因, 利用同源重组的原理, 通过ATMA或原生质体转化的方法进行转化, 设计4对引物P1F/R, P2F/R, P3F/R和P4F/R验证转化子; B: $\Delta PfcsnE$ 突变株PCR验证结果, 1.5~2kb的条带仅在突变株中会出现, 而目的基因的条带仅在WT菌株中出现; C: $\Delta PfcsnE^C$ 菌株PCR验证结果, 2.2和2.9kb的条带在 $\Delta PfcsnE^C$ 菌株中都会出现, WT菌株仅出现2.2kb的条带, 而 $\Delta PfcsnE$ 突变株仅出现2.9kb的条带

图2 *PfcsnE*是*P. fici*分生孢子发育必不可少的

A: WT, $\Delta PfcsnE$ 和 $\Delta PfcsnE^C$ 菌株的表型。3个菌株分别于光照和黑暗条件下培养, PDA培养基, 25℃, 7天。B: 第5天测量菌落直径, 每个菌株设3个重复, 星号表示差异显著

$\Delta PfcsnE$ 和 $\Delta PfcsnE^C$ 菌株在PDA培养基上, 25℃生长7天后, 用HPLC定量分析4个主要代谢产物的产量, 4个化合物分别是: asperpentyn, ficiolide A, chloroisosulochrin和pestheic acid (图3)^[29]. 参考之前的方法纯化得到这4个化合物作为标准品^[20]. 与WT相比, $PfcsnE$ 突变株中chloroisosulochrin的产量显著升高, $P<0.01$; 而ficiolide A的产量明显降低, $P<0.05$ (图3A和B). 另外两个化合物asperpentyn和pestheic acid产量变化均未达到显著水平 (图3A和B). 这些结果表明, $PfcsnE$ 对 $P. fici$ 的次级代谢有很重要的调控作用.

2.4 转录组分析 $PfcsnE$ 基因缺失突变株

鉴于以上实验结果, 可以确定 $PfcsnE$ 对 $P. fici$ 的生长发育和次级代谢都有明显的调控作用. 因此对WT和 $\Delta PfcsnE$ 进行转录组测序, 从基因层面分析 $PfcsnE$ 是如何参与调控发育和代谢的. 转录组测序结果显示, 在14794个基因中, 3.54%表达差异达到极显著水平($\text{Log}_2 \text{ratio} \geq 3.0$, $P<0.01$), 8.37%的基因表达差异达到显著水平($\text{Log}_2 \text{ratio} \geq 2.0$, $P<0.01$) (图4A, 网络版附表1). 将表

达有差异的基因进行功能分类, 包括未被鉴定功能的蛋白在内共分为10类 (图4B, 网络版附表2). 差异基因数量最多的分类为初级代谢和次级代谢. 在 $P. fici$ 基因组里的76个生物合成基因簇中, 有12个基因簇的骨架基因的表达都被显著上调或下调 (图5). 此外, 多个涉及孢子形成的基因在 $\Delta PfcsnE$ 菌株中的表达量都下调 (网络版附表3).

3 讨论

随着生物信息学技术的发展与成本的降低, 越来越多的真菌基因组已经测序完成^[30]. 通过基因组学分析, 已经鉴定了成千上万的生物合成基因簇, 合成多种多样的化合物, 包括聚酮类(polyketides)、非核糖体多肽类(non-ribosomal peptides)、生物碱类(alkaloids)、萜类(terpenes)等^[31,32]. 这些化合物并不是机体正常生长发育所必需的, 但在真菌生物学中起到非常重要的作用, 如防御功能^[33]. 然而, 在化学层面, 这些天然产物只有一小部分被开发利用. 因为在实验室培养条件下大多数的生物合成的基因簇“沉默”或表达量低于可以检测到的水平, 利用传统的方法挖掘天然产物面临

图3 WT, $\Delta PfcsnE$ 和 $\Delta PfcsnE^C$ 菌株次级代谢产物分析

A: 210 nm检测波长下分析次级代谢产物, 菌株在PDA培养基, 25℃, 生长7天; B: 与WT相比, $\Delta PfcsnE$ 和 $\Delta PfcsnE^C$ 菌株化合物1~4的相对产量;

C: 本研究分析的 $P. fici$ 中4个已知的化合物1: asperpentyn, 2: ficiolide A, 3: chloroisosulochrin, 4: pestheic acid

图4 转录组分析

A: WT和 $\Delta PfcsnE$ 菌株整体基因表达差异, 表达差异显著的基因用红色点表示, 表达差异不明显的基因用黑色点来表示, $\log_2 \text{ ratio} > 0$, 基因被上调, 而 $\log_2 \text{ ratio} < 0$, 基因被下调, 经统计共有7200个基因被上调, 7597个基因被下调; B: 对 $\log_2 \text{ ratio} > 2.0$ 的基因进行功能分类, 红色和蓝色分别代表下调基因和上调基因的数量

很大的挑战^[34-36]. 为了提高天然产物的产量, 许多方法已经被采用, 包括改变光照条件及改变涉及光调控的基因^[37-39], 对合成次级代谢产物前体的基因进行操作^[40], 氧化胁迫相关基因^[19], 及异源表达^[41]. 然而, 在后基因组时代, 对重要的调控因子进行基因操纵是发现新颖天然产物的最有效的手段之一, 尤其是挖掘植物内生真菌的天然产物.

本课题组所研究的PfCsnE, 在真菌中是一个高度保守的CSN复合体亚基, 影响*P. fici*的生长发育和次级

代谢. 已经有研究证明, CsnE涉及多细胞生物体的生长发育, 敲除CsnE能导致植物幼苗和动物早期胚胎死亡, 并且与人类肿瘤细胞的形成有关. 在构巢曲霉中, 敲除*csnE*阻碍有性子实体的形成^[15]并且激活一个沉默的PKS基因簇从而鉴定了抗菌素DHMB^[18]. 在粗糙脉胞菌(*Neurospora crassa*)中, Csn5通过调节E3连接酶的活性, 对菌丝的生长、分生孢子的发育及生理节奏起到非常重要的作用. 与曲霉中的CsnE类似, 本研究组发现PfCsnE参与*P. fici*生长发育的调控. 敲除

*PfcsnE*基因, 突变株不再产生分生孢子, 而在回补菌株中, 孢子恢复产生(图2A). 这表明PfCsnE对*P. fici*无性发育具有非常重要的作用. 转录组分析显示, 多个参与分生孢子形成的基因都受到PfCsnE的调控(网络版附表3). 此外, $\Delta PfcsnE$ 突变株的菌丝的生长速度明显慢于WT和 $\Delta PfcsnE^C$ (图2B). 然而, 粗糙脉胞菌中CsnE的同源蛋Csn5缺失突变株的菌丝生长速度要比野生型菌株稍快^[27]. 总之, CsnE对*P. fici*分生孢子的形成和发育起到至关重要的作用. 本研究组还发现, WT和 $\Delta PfcsnE$ 突变株的代谢图谱存在很大的变化. $\Delta PfcsnE$ 突变株中chloroisosulochrin的产量显著升高($P<0.01$), ficiolide A的产量明显降低($P<0.05$)(图3), 另外两个化合物asperpentyn和pestheic acid的产量变化未达到显著的水平.

为了解释PfCsnE是如何调控*P. fici*生长发育和次级代谢的, 通过转录组测序比较了WT和 $\Delta PfcsnE$ 突变株之间基因表达的差异. 在 $\Delta PfcsnE$ 突变株中, 8.37%的基因的表达发生改变(图4A, 网络版附表1), 这与构巢曲

霉中15.4%基因表达受CsnE的影响基本上一致^[13]. 这些基因中有许多次级代谢产物合成基因, 且表达差异均达到显著水平($P<0.01$)(图5). 本实验极大拓展了CsnE在富含次级代谢产物的植物内生真菌中的功能研究. PfCsnE对孢子发育和次级代谢的调控将为真菌新颖天然产物的发现提供新的方法.

图5 PfCsnE对次级代谢产物合成基因表达的调控
数据选取自Log₂ ratio ≥ 2.0 , $P<0.01$ 的次级代谢产物合成基因, 纵坐标Log₂ ratio表示基因被调控程度的大小

参考文献

- Wei N, Deng X W. The COP9 signalosome. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, 19: 261–286
- Wei N, Serino G, Deng X W. The COP9 signalosome: more than a protease. *Trends Biochem Sci*, 2008, 33: 592–600
- Schwechheimer C, Isono E. The COP9 signalosome and its role in plant development. *Eur J Cell Biol*, 2010, 89: 157–162
- Wei N, Chamovitz D A, Deng X W. *Arabidopsis* COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell*, 1994, 78: 117–124
- Wei N, Kwok S F, von Arnim A G, et al. *Arabidopsis* COP8, COP10, and COP11 genes are involved in repression of photomorphogenic development in darkness. *Plant Cell*, 1994, 6: 629–643
- Menon S, Chi H, Zhang H, et al. COP9 signalosome subunit 8 is essential for peripheral T cell homeostasis and antigen receptor-induced entry into the cell cycle from quiescence. *Nat Immunol*, 2007, 8: 1236–1245
- Cope G A, Suh G S B, Aravind L, et al. Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science*, 2002, 298: 608–611
- Zhou C, Seibert V, Geyer R, et al. The fission yeast COP9/signalosome is involved in cullin modification by ubiquitin-related Ned8p. *BMC Biochem*, 2001, 2: 7
- Mundt K E, Liu C, Carr A M. Deletion mutants in COP9/signalosome subunits in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* display distinct phenotypes. *Mol Biol Cell*, 2002, 13: 493–502
- Kim T H, Hofmann K, von Arnim A G, et al. PCI complexes: pretty complex interactions in diverse signaling pathways. *Trends Plant Sci*, 2001, 6: 379–386
- Busch S, Eckert S E, Krappmann S, et al. The COP9 signalosome is an essential regulator of development in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 2004, 49: 717–730
- Lima J F, Malavazi I, von Zeska Kress Fagundes M R, et al. The *csnD/csnE* signalosome genes are involved in the *Aspergillus nidulans* DNA damage response. *Genetics*, 2005, 171: 1003–1015
- Nahlik K, Dumkow M, Bayram O, et al. The COP9 signalosome mediates transcriptional and metabolic response to hormones, oxidative stress protection and cell wall rearrangement during fungal development. *Mol Microbiol*, 2010, 78: 964–979
- Beckmann E A, Köhler A M, Meister C, et al. Integration of the catalytic subunit activates deneddylase activity *in vivo* as final step in fungal COP9 signalosome assembly. *Mol Microbiol*, 2015, 97: 110–124

- 15 Busch S, Schwier E U, Nahlik K, et al. An eight-subunit COP9 signalosome with an intact JAMM motif is required for fungal fruit body formation. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2007, 104: 8089–8094
- 16 Christmann M, Schmalzer T, Gordon C, et al. Control of multicellular development by the physically interacting deneddylases DEN1/DenA and COP9 signalosome. [PLoS Genet](#), 2013, 9: e1003275
- 17 Braus G H, Irniger S, Bayram O. Fungal development and the COP9 signalosome. [Curr Opin Microbiol](#), 2010, 13: 672–676
- 18 Gerke J, Bayram O, Feussner K, et al. Breaking the silence: protein stabilization uncovers silenced biosynthetic gene clusters in the fungus *Aspergillus nidulans*. [Appl Environ Microbiol](#), 2012, 78: 8234–8244
- 19 Wang X, Wu F, Liu L, et al. The bZIP transcription factor PfZipA regulates secondary metabolism and oxidative stress response in the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. [Fungal Genet Biol](#), 2015, 81: 221–228
- 20 Wu G, Zhou H, Zhang P, et al. Polyketide production of pestaloficiols and macrodiolide ficiolides revealed by manipulations of epigenetic regulators in an endophytic fungus. [Org Lett](#), 2016, 18: 1832–1835
- 21 Liu L, Liu S, Jiang L, et al. Chloropupekananin, the first chlorinated pupukeanane derivative, and its precursors from *Pestalotiopsis fici*. [Org Lett](#), 2008, 10: 1397–1400
- 22 Xu X, Liu L, Zhang F, et al. Identification of the first diphenyl ether gene cluster for pestheic acid biosynthesis in plant endophyte *Pestalotiopsis fici*. [ChemBioChem](#), 2014, 15: 284–292
- 23 Zhang A, Lu P, Dahl-Roshak A M, et al. Efficient disruption of a polyketide synthase gene (*pksI*) required for melanin synthesis through *Agrobacterium*-mediated transformation of *Glarea lozoyensis*. *Mol Genet Genomics*, 2003, 268: 645–655
- 24 Yu D, Xu F, Zi J, et al. Engineered production of fungal anticancer cyclooligomer depsipeptides in *Saccharomyces cerevisiae*. [Metab Eng](#), 2013, 18: 60–68
- 25 Colot H V, Park G, Turner G E, et al. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2006, 103: 10352–10357
- 26 Yin W B, Reinke A W, Szilágyi M, et al. bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*. [Microbiology](#), 2013, 159: 77–88
- 27 Zhou Z, Wang Y, Cai G, et al. *Neurospora* COP9 signalosome integrity plays major roles for hyphal growth, conidial development, and circadian function. [PLoS Genet](#), 2012, 8: e1002712
- 28 Gerke J, Braus G H. Manipulation of fungal development as source of novel secondary metabolites for biotechnology. [Appl Microbiol Biotechnol](#), 2014, 98: 8443–8455
- 29 Liu L. Bioactive metabolites from the plant endophyte *Pestalotiopsis fici*. [Mycology](#), 2011, 2: 37–45
- 30 Yun C S, Motoyama T, Osada H. Biosynthesis of the mycotoxin tenuazonic acid by a fungal NRPS-PKS hybrid enzyme. [Nat Commun](#), 2015, 6: 8758
- 31 Hoffmeister D, Keller N P. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. [Nat Prod Rep](#), 2007, 24: 393–416
- 32 Keller N P. Translating biosynthetic gene clusters into fungal armor and weaponry. [Nat Chem Biol](#), 2015, 11: 671–677
- 33 Rohlf M, Churchill A C L. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. [Fungal Genet Biol](#), 2011, 48: 23–34
- 34 Brakhage A A. Regulation of fungal secondary metabolism. [Nat Rev Micro](#), 2012, 11: 21–32
- 35 Netzker T, Fischer J, Weber J, et al. Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. [Front Microbiol](#), 2015, 6: 299
- 36 Rutledge P J, Challis G L. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. [Nat Rev Micro](#), 2015, 13: 509–523
- 37 Bayram Ö, Feussner K, Dumkow M, et al. Changes of global gene expression and secondary metabolite accumulation during light-dependent *Aspergillus nidulans* development. [Fungal Genet Biol](#), 2016, 87: 30–53
- 38 Castrillo M, Avalos J. Light-mediated participation of the VIVID-like protein of *Fusarium fujikuroi* VvdA in pigmentation and development. [Fungal Genet Biol](#), 2014, 71: 9–20
- 39 Pruss S, Fetzner R, Seither K, et al. Role of the *Alternaria alternata* blue-light receptor LreA (white-collar 1) in spore formation and secondary metabolism. [Appl Environ Microbiol](#), 2014, 80: 2582–2591
- 40 Wang P M, Choera T, Wiemann P, et al. TrpE feedback mutants reveal roadblocks and conduits toward increasing secondary metabolism in *Aspergillus fumigatus*. [Fungal Genet Biol](#), 2016, 89: 102–113
- 41 Yaegashi J, Oakley B R, Wang C C C. Recent advances in genome mining of secondary metabolite biosynthetic gene clusters and the development of heterologous expression systems in *Aspergillus nidulans*. [J Ind Microbiol Biotechnol](#), 2014, 41: 433–442