

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-009

酵母终止子工程：从机理探索到人工设计

盛月, 张根林

(石河子大学化学化工学院, 新疆兵团化工绿色过程重点实验室, 新疆 石河子 832003)

摘要: 生物系统的复杂性为生物元器件的构建提出了挑战, 新型控制元件的发现和稳定可调节的元件设计成为合成生物学的重要内容之一。终止子作为基因元件独立于编码基因行使终止转录的功能, 是一种重要的合成生物学控制元件。研究表明终止子作用有强有弱, 终止子的选择会直接影响 mRNA 的量, 并且随着终止子结构与功能的逐渐清晰和对转录终止机理的深入解析, 以短小、可控、可设计为特征的终止子工程得以快速发展。本文以常规酿酒酵母为基础, 系统总结了酿酒酵母中终止子元件在结构发现、功能表征、转录终止机理方面的最新研究进展, 并讨论了终止子的人工设计及在途径工程精细调控领域的应用情况, 展望了终止子工程面临的挑战、可能的解决途径及在非模式酵母中发展的潜力和意义。这为研究人员开发合成生物学元件和异源合成途径优化提供了科学的理论参考。

关键词: 酿酒酵母; 终止子; mRNA加工; 转录终止; 代谢途径调控

中图分类号: Q81 **文献标志码:** A

Yeast terminator engineering: from mechanism exploration to artificial design

SHENG Yue, ZHANG Genlin

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Key Laboratory for Green Processing of Chemical Engineering of Xinjiang Bingtuan, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang, China)

Abstract: The complexity of biological systems poses challenges for the construction of biological components. The discovery of new control parts and the design of stable and adjustable parts have become one of the important contents of synthetic biology. Acted as a genetic part independently of the coding gene to terminate transcription, a terminator is an important biological part for tuning gene expression when designing synthetic gene networks. The activity of terminator can be strong or weak, thus the choice of terminator will directly affect the amount of mRNA produced. With the gradual clarification of the structure and function on terminator and in-depth analysis of the mechanism of transcription termination, terminator engineering has been rapidly developed to construct shorter, controllable and designable terminators. In this review, the progress about the structural discovery, functional characterization, and

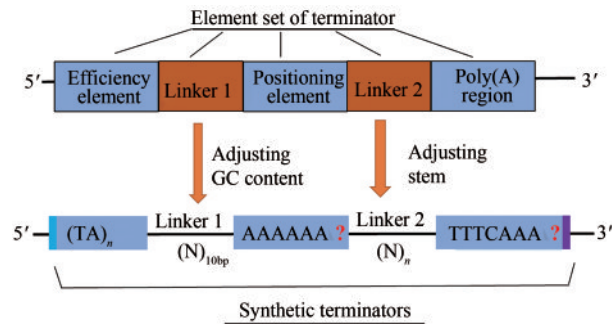
收稿日期: 2020-02-29 修回日期: 2020-04-15

基金项目: 国家自然科学基金 (21676167); 兵团中青年科技创新领军人才计划 (2017CB007)

引用本文: 盛月, 张根林. 酵母终止子工程: 从机理探索到人工设计[J]. 合成生物学, 2020, 1(6): 709-721

Citation: SHENG Yue, ZHANG Genlin. Yeast terminator engineering: from mechanism exploration to artificial design[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(6): 709-721

transcription termination mechanism of terminator in *Saccharomyces cerevisiae* are systematically summarized. The artificial design of terminator and its application in the field of fine regulation of pathway engineering are discussed. The challenges and possible solutions for terminator engineering, potential and significance for developing terminator engineering in non-model yeast are also prospected. This review provides a theoretical guidance for researchers to develop synthetic biological elements and optimization of heterologous synthetic pathways.



Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; terminator; mRNA processing; transcription termination; metabolic pathway regulation

合成生物学作为21世纪一个充满活力的新兴交叉学科，以工程化思想理性设计改造生命体、创造新功能。该技术突破了生命发生与进化的自然法则，推动了解读生命到编写生命的跨越，可为破解资源、能源、健康、环境、安全等重大难题提供重要技术支撑。通过引入新的合成途径或功能模块，已在微生物中实现了青蒿酸、人参皂苷、紫杉二烯、异丁醇等复杂或高值化合物的合成，在化学品合成、药物发现与制造、农业生产等领域均表现出了重要的应用价值^[1-2]。

有效的生物元器件是途径组装和生命体改造的基础，其中控制元件更是影响人工生物体系的重要因素之一。原核生物中含有上万种调节线路，它们能够在转录或翻译水平对环境信号进行感应和应对，人们成功地从这些线路中挖掘出了启动子、转录调控因子、核糖体结合位点等大量的控制元件，并构建了人工核酸开关等应用于代谢途径的精细调控^[3]。但由于真核生物复杂的遗传特性，在其中开发的控制元件相对单一，常见的控制元件主要是启动子，限制了真核生物中合成线路的构建和应用^[4]。

近年来，科学家在酿酒酵母、大肠杆菌、病毒、哺乳动物和十字花科植物等物种中开展了大量的转录调控研究，发现不少基因的3'-UTR区域含有调控mRNA稳定性和亚细胞定位相关的功能

元件。3'-UTR是mRNA上从终止密码子到poly(A)尾巴的一段RNA序列，长度从几百个碱基至上千个碱基不等，常为冗余的重复序列，并且大多数可以形成茎环。将位于mRNA 3'-UTR区域内能够利用自身“发卡”结构阻止RNA聚合酶II在模板上移动，并与其他高度保守元件和蛋白因子共同协作实现3'末端的加工，给予RNA聚合酶II转录终止信号，促进转录终止的元件称为终止子(terminator)^[5-6]。酿酒酵母每个基因的表达均受终止子元件的调控，当转录进行到3'末端时，终止子利用自身富含GC的区域形成一段稳定的发卡结构，阻碍了RNA聚合酶II在模板链上移动，导致转录终止。

不同活性终止子的使用能够影响mRNA的稳定性、切割效率、聚腺苷酸化反应以及3'-UTR区域的长度和稳定性，最终影响基因表达程度^[7-10]。基于对终止子关键核心序列认识的不断提高，以更短、性能更强、活性可控、可设计为特征的终止子工程迅速发展。以这种表达“输出”控制方式的工程应用也不断涌现，表现出了良好的应用潜力。因此，本文作者针对合成生物技术常用的酿酒酵母模式底盘，以机理探索到人工设计为主线总结终止子的研究进展，主要包括终止子元件的结构与功能、作用机理、人工设计及应用进展，并对终止子工程面临的问题和发展趋势做出讨论，为开发合成生物学元件和异源合成途径优化提供有用的信息。

1 酿酒酵母终止子的结构与功能

1.1 终止子元件的基本构成

合成生物学按照工程学理念，将生命体系中发挥功能最简单、最基本的单元统称为生物元件，调控元件是生物调控的重要组成部分，启动子、终止子、转录调控蛋白因子等可以作为调控元件作用于基因转录、翻译水平^[11-12]。为了明确酿酒酵母 mRNA 3'末端形成所涉及的元件，丰富途径工程发展，1996年 Guo 和 Sherman 率先定义了酵母终止子形成所必需的最小元素集：效率元件（efficiency element, EE）、位置元件（positioning element, PE）、poly(A)位点 [poly(A) sites, $Py(A)n$] 以及围绕 poly(A)位点的富 T 区域 [图 1 (a)]^[13]。若将这些元素组合在一起，足够发挥酵母 3'末端的转录终止功能。

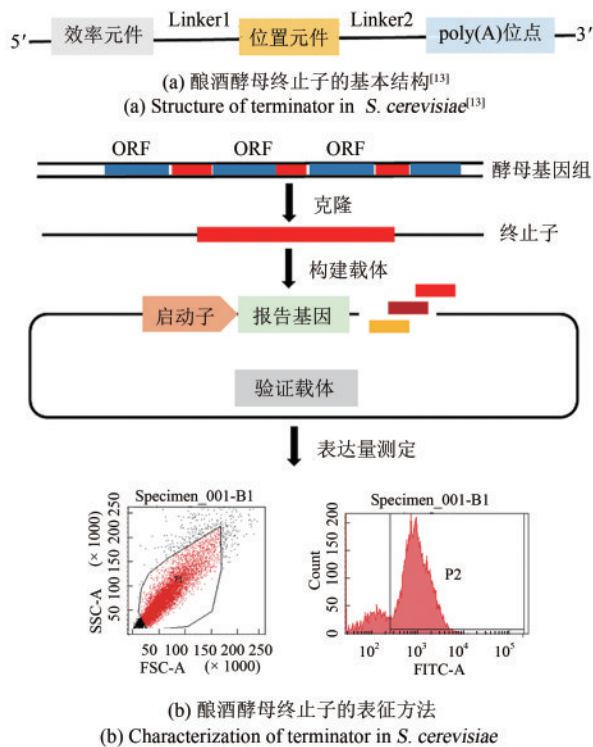


图1 酿酒酵母终止子的基本结构与表征方法^[13]

Fig. 1 Structure of terminator in *S. cerevisiae* and their characterization^[13]

现已证明，效率元件一般位于终止子序列最上游，富含 TA，序列 TATATA、TATGTA、TACATA、

TAAATA、TACCTA 是常见的效率元件，当序列为 TATATA 时最有利于终止子效率文件的活性，并有提高下游位置元件使用效率的作用^[14-15]。终止子的终止效果与效率元件的长度成正比，但效率元件的序列长度最少不能小于 6 bp，大约 50% 终止子均有 TATATA 序列，其中第一和第五个碱基 T 对 3' 末端加工影响最大。另外，效率元件能够辅助下游位置元件定位，提高元件使用效率。mRNA 3'末端的形成需要 poly(A)位点上游的恒定位置元件进行终止信号的识别。位置元件是富含 A 的元件，位于 poly(A)位点上游约 10~30 bp，序列 AAAAAAAAA、TTA-AGAAC、AAGAA、AATAAATGA、AAAAAA、AATAAA 是常见的位置元件。当位置元件的序列为 AAAAAA 时，类似于哺乳动物中的六聚体定位 poly(A)位点，终止子活性最强。位置元件募集大量转录终止因子、切割和多聚腺苷酸化因子共同完成加工和剪切过程，辅助识别切割位点，指导 poly(A)位点的定位^[16-20]。Guo 利用终止子 CYC1t 和 ADH1t 对 poly(A)位点的序列进行了系统研究，表明 poly(A)位点实际序列由胞苷或胸腺嘧啶加上一个或多个腺苷残基组成，夹在两个富含 U/GU 的侧翼序列之间，TTTCAA 是聚腺苷酸化发生的最佳序列，切割位点通常发生在核苷酸 CA 上，第二个核苷酸 A 始终是一个发生切割的腺苷残基，切割完成后添加 poly(A)尾巴标志着转录完成，poly(A)位点的位置主要由效率元件和位置元件共同决定^[13]。侧翼富含 U/GU 的区域可用于调节 poly(A)位点的使用效率和精确切割位置，以完成 mRNA 3'末端的多聚腺苷酸化加工形成成熟的 mRNA^[21-26]。

显然，这些简单的元素共同参与了 3'末端的形成过程，但其他序列也会影响终止子的强度。研究表明，终止子的终止作用除了与上述元件及它们的序列有关之外，还与各个元件之间的连接序列 Linker 1 和 Linker 2 的序列和长度有关。如果效率元件、位置元件和 poly(A)位点的序列是确定的，那么 Linker 1 序列的 GC 含量和 Linker 2 序列形成的茎环结构将成为影响终止子强度的重要因素^[27-28]。Guo^[13] 等通过 *CYC1-lacZ* 融合基因的转录分析证明，位置元件与效率元件相距 10~20 bp，与 poly(A)位点相距 10~30 bp。

1.2 终止子的功能表征

终止子的活性一般通过所控制基因的蛋白质表达水平来表征。常利用绿色荧光蛋白基因(*eGFP*)、红色荧光蛋白基因(*mKO2*)等报告基因为功能基因,将终止子插入报告基因的下游,通过流式细胞仪等手段检测报告基因的表达情况,可将样品荧光值($[GFP]_i$)与对照组荧光值($[GFP]_0$)差值的对数(FI)作为终止子活性值,该值越大表明终止子的转录终止能力越强[图1(b)],(P1为对照组-*eGFP*阴性区域,P2为样品组-*eGFP*阳性区域)。终止子是3'-UTR区域的功能元件,多为重复的冗余序列,常将位于基因3'-UTR区的序列认为是终止子所在区域,因此在分析终止子时,常将蛋白质编码序列下游约500 bp的序列或全部序列作为终止子元件,每个编码序列都与一个实质性的3'-UTR序列相关^[29-30]。Yamanishi等^[30]从酵母基因组中克隆出约500 bp的3'-UTR区域,在*eGFP*下游插入不同的终止子,表征了酿酒酵母5880个基因中的5302个终止子,相对于PGK1终止子的FI值而言,发现酵母天然终止子的活性范围可达0.036~2.52。Curran等^[27]表征了34个不同的酵母终止子,发现最活跃的终止子能使目标基因的mRNA半衰期增加2.5倍,而使蛋白质过表达6.5倍。

1.3 终止子的分类

为了方便终止子研究与使用,可将终止子根据活性大小按照强、中、弱进行分类。由于强终止子序列更容易形成稳定的发夹结构,不仅能够更快速地阻止RNA聚合酶II在模板链上继续前行,促进转录终止,也能提高mRNA的稳定性,增加蛋白质的积累。因此强终止子的使用能够提高mRNA和蛋白质的产量^[31-32]。弱启动子与强终止子的互补使用能达到和强启动子相似的基因表达效果,甚至某些情况下弱启动子结合中强度终止子可以使蛋白质表达效率提高几倍,但诱导型启动子和强启动子与终止子活性的影响不大。研究酵母转录和聚合酶的催化中心发现,终止子的终止调控作用是酵母基因表达不可或缺的。终止子作为基因调控元件,主要功能是负责转录终止、

mRNA 3'末端加工,最终通过影响mRNA的稳定性、翻译效率和定位调节蛋白质的产生。然而,终止子作为基因元件是独立于报告基因和编码区序列而行使功能的,其活性不受所表达功能基因的调节。通过测量天然终止子的活性,已经确定终止子的缺失会导致转录过程的冗长,而出现转录不稳定。本课题组前期用*eGFP*验证了糖酵解途径和TCA循环途径中的100个终止子,以酿酒酵母基因组为模板扩增相应的终止子片段,构建“TYS1p+*eGFP*+Terminators”基因表达盒,流式细胞仪检测终止子强度,也发现了天然终止子的活性差异,强度范围可达0.0613~1.8002^[33]。以常用的终止子PGK1t的FI值为标准,人为地将FI值小于0.0613的终止子划分为弱终止子;将FI值大于0.9826的终止子划分为强终止子;将FI值在0.0613和0.9826之间的终止子划分为中等强度终止子。因此,在100个酵母天然终止子文库里含有45个强终止子、31个中等强度终止子和24个弱终止子,其中终止子MIC60、SOR1t、ELO2t、NTA1t、MMS22t和GRS2t是第一次被表征和报道。

2 酿酒酵母终止子的转录调控机理

转录是将RNA聚合酶募集到启动子,合成mRNA并在终止子序列上解离RNA聚合酶的高度复杂的过程,受到多种因素的影响。其中两个关键的转录调控事件是转录起始调控和转录终止调控^[34-36]。转录调控指通过改变转录速率从而改变基因表达的水平,可以控制转录何时发生以及产生多少,是基因表达调节控制中的一个重要环节^[37-40]。研究表明,基因正确的表达需要RNA聚合酶II的有效终止以避免转录干扰和非编码RNA的合成。终止滞后将破坏同一染色体上的其他基因表达;终止提前将产生缩短的有缺陷的mRNA,从而导致蛋白质的变异,因此转录过程受到严格的调控。酵母的转录终止涉及转录终止因子、多聚腺苷酸化因子、组蛋白、核小体等,终止子利用自身的功能元件募集这些调控因子共同完成转录终止^[41-43]。

酵母mRNA 3'末端是通过转录终止形成的,与其他高等真核生物相比,使用了更加复杂的加工

机制。从机制上讲，终止子定义了3'-UTR的序列和结构，在3'末端发出转录终止信号并利用自身元件募集蛋白因子负责转录终止，切割新生的mRNA链发生聚腺苷酸化反应，有助于mRNA的稳定性。终止子区域的活性与mRNA丰度成正相关，表明终止子是mRNA丰度的决定因素，由于终止子在mRNA加工中的重要性，最不活跃的终止子区域倾向于编码更长的3'-UTR区域，缺少终止子会产生延伸的转录本，导致转录本不稳定而无法翻译^[44-47]。

2.1 转录终止因子在转录调控中的作用

终止子元件作为3'末端区域重要的调控元件，具有调控mRNA亚细胞定位、稳定性及翻译效率的作用。终止子区域的转录加工通常涉及两个调控过程，转录终止涉及3'末端mRNA的切割和poly(A)位点的剪切；转录后调控涉及3'-UTR区域的稳定性、翻译效率和mRNA的定位。终止子内的高度保守序列招募RNA结合蛋白和相关蛋白因子，用于转录后调节基因表达的各个方面^[48-50]。具体而言，终止子元件上的功能元件作为转录终止的修饰位点，通过招募与转录调控相关的切割因子IA、切割因子IB、聚腺苷酸化特异性因子复合物CPF，共同完成3'末端复杂的加工机制^[51-53]。在酿酒酵母中已经鉴定出超过20种以上的蛋白质因子与mRNA 3'末端加工有关，但大多数蛋白质因子都没有关于详细功能的解析或与终止子结合靶标的信息^[54]。

终止子通过切割因子IA、切割因子IB识别自身效率元件和位置元件进行3'末端的加工和切割。而多聚腺苷酸化反应首先由切割因子IB和CPF蛋白质复合物识别终止子元件上的poly(A)位点及围绕poly(A)位点的富U/GU区域进行切割，在多聚腺苷酸聚合酶的催化下，3'末端会合成具有一定长度的poly(A)尾巴，将mRNA从细胞核内转运至细胞质中翻译成蛋白质^[55-57]。切割因子IA、IB的亚基根据其不同的蛋白质结构域和裸露在外的氨基酸残基行使不同的功能，结合不同的终止子区域(图2)。突变或过表达切割因子IA、IB均会造成转录终止缺陷，但并不会完全停止转录。同样，终

止子的缺失可能延长转录过程造成下游基因的通读，导致目标基因和蛋白质表达量的减少^[58-59]。遗传和功能研究表明转录终止因子与RNA的精确结合对于3'末端转录终止有巨大作用，在当前的酿酒酵母转录终止因子研究中，仅有非编码蛋白Nrd1、Nab3在全基因组上的靶标RNA序列研究较为清楚，分别识别UGUAG/A和UCUUG^[60-62]。另外，目前已确认转录终止因子Pcf11、Rtt103、Mbp1、Fkh1主要作用于聚腺苷酸化反应，但它们如何与终止子结合行使终止功能还不完全清楚^[63-66]。

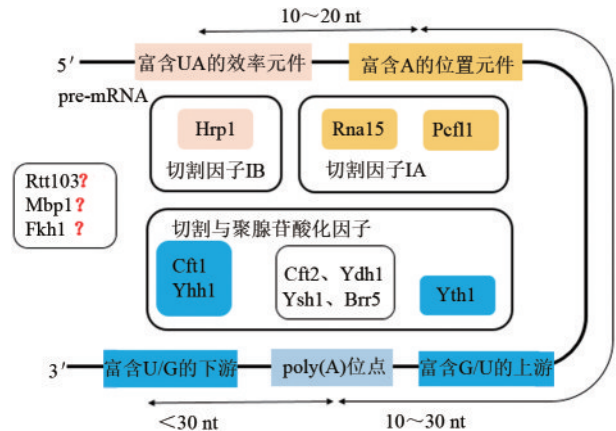


图2 酿酒酵母终止子参与的可能终止机制

Fig. 2 Possible termination mechanism of terminators in *S. cerevisiae*

在上述转录终止因子中，发现切割因子IB家族包含的转录终止因子Pcf11与裂殖酵母、哺乳动物、人、果蝇等中都含有类似的功能同系物，并贯穿于整个转录终止过程，推测Pcf11具有多种功能^[67-71]。第一，Pcf11能够识别终止子区域上的位置元件，利用自身蛋白质结构域招募蛋白质因子Clp1、Rna14、Rna15和切割与多聚腺苷酸化因子CPF共同完成3'末端加工过程，同时促进新生pre-RNA链从DNA-RNA-RNA复合物中释放，促进转录终止^[72-73]。第二，Pcf11介导与poly(A)位点相关的切割和多聚腺苷酸化反应，在poly(A)位点处完成切割并添加poly(A)尾巴，促进mRNA成熟，并与非编码RNA结合切割内含子连接外显子，构建不同长度的转录本^[74-75]。第三，在转录延伸过程进行到3'末端时，Pcf11蛋白发生磷酸化反应与RNAP II Rbp1亚基CTD区域中磷酸化的Ser2、Ser5结合，促进mRNA切割、RNAP II从DNA模

板链上的解离, 开启下一轮转录^[76-79]。总之, 转录终止因子Pcf11通过识别终止子元件, 参与mRNA 3'末端的加工和聚腺苷酸化反应, 既能影响转录终止的时机又能调控mRNA的稳定性, 对转录过程具有全局调控作用, 是一种重要的潜在全局调控元件。然而, 目前对其具体的转录终止机制还不清楚, 特别是关于Pcf11是如何与终止序列识别并响应的、它的靶标RNA如何、Pcf11是如何参与聚腺苷酸化反应进行poly(A)的位点选择的。相信通过构建转录终止因子Pcf11等缺失菌株, 利用高通量方法深入分析转录终止因子与终止子的结合位点和规律, 将会进一步实现在全基因组层面分析转录终止过程的详细调控网络, 为转录终止机理提供新的研究线索。

2.2 依赖于poly(A)位点的转录终止

真核生物的遗传信息由三种聚合酶进行转录, 作用于不同类型的转录本, RNA聚合酶II转录大量mRNA和一些经典的非编码功能基因SnoRNA和SnRNA, 这些转录产物的生物合成是一个严格调控过程, 与其他RNA加工事件共同进行^[80-81]。对于蛋白质编码基因, 转录终止主要依赖于poly(A)位点的终止路径, 与切割和聚腺苷酸化因子相关。在真核生物中除了组蛋白mRNA几乎绝大多数真核生物mRNA和lncRNA的3'末端都具有一串连续的腺苷, 被称为poly(A)尾巴。poly(A)尾巴与mRNA的出核转运、稳定性和翻译效率息息相关, 具有重要的生物学意义^[82-83]。

研究表明, 绝大多数的mRNA具有一个或两个以上的多聚腺苷酸化位点, 酵母、哺乳动物、拟南芥高达70%以上基因具有选择性多聚腺苷酸化现象, 在3'末端加工中具有重要作用, 并受到复杂而精细的调控, 涉及到许多蛋白质-RNA之间的相互作用^[84-85]。这种相互作用可分为两种情况: 一种拥有多个poly(A)位点, 并且都在3'-UTR区对应的mRNA编码区完全一样, 只是3'-UTR长短不同称为UTR-APA; 一种是由选择性切割导致, poly(A)位点位于不同的外显子区域编码序列有可能发生改变, 称为CR-APA^[86-88]。在此过程中, 贯穿整个转录过程的转录终止因子Pcf11作为“加工支架”,

能够辅助CPF识别poly(A)位点的侧翼元件, 有助于切割因子在poly(A)位点的准确切割, 辅助蛋白质复合物与pre-mRNA的稳定结合, 有助于mRNA在蛋白质合成中有效地发挥作用^[89-90]。可以看出, poly(A)位点选择性多聚腺苷酸化会直接影响到mRNA的稳定性和翻译效率。

poly(A)位点位于整个转录本的3'末端, 位点的选择直接影响到mRNA最重要的调控区3'-UTR, 是绝大多数RNA结合蛋白和microRNA调控的靶标区域, 因此poly(A)位点的选择会直接影响到mRNA的稳定性和翻译效率^[91-92]。然而, 酵母中选择性多聚腺苷酸化的具体调控机理尚不明确, 对其具体分子机制及功能性结果等尚处于研究的起步阶段。认为多聚腺苷酸化过程通常与终止子序列具有内在联系, 终止子元件上的poly(A)位点与多聚腺苷酸化反应必需的蛋白质复合物的识别密切相关, 其中3'末端的切割和多聚腺苷酸化是两个重要的步骤^[93-95]。pre-mRNA切割和聚腺苷酸化是一种机制, 令编码蛋白mRNA和长链非编码RNA的3'末端中断。该过程涉及大量多聚腺苷酸化因子与终止子功能元件之间的相互作用, 其中poly(A)位点的准确切割取决于切割和多聚腺苷酸化因子CPF蛋白质复合物, 识别终止子区域内的poly(A)位点、富含GU/U的侧翼元件, 促进poly(A)位点的多聚腺苷酸化反应过程。

2.3 不依赖poly(A)位点的转录终止途径

与蛋白质编码基因的转录终止相比, 酿酒酵母大部分非编码转录事件不依赖于RNA切割终止, 而是需要Nrd1-Nab3-Sen1蛋白复合物途径终止。该途径包括大多数小核仁RNA、隐形不稳定转录本等。非编码蛋白Nrd1、Nab3在全基因组上的靶标RNA序列研究较为清楚, 通过与RNA聚合酶II的亚基Rbp1和终止子区域中的GUA/G核苷酸相互作用, 分别识别UGUAG/A和UCUUG, 其中Nrd1还可以通过促进过早转录终止来调控数百种蛋白质编码基因, 这些靶标RNA序列在SnoRNA序列中是频繁的, 特定的RNA基序对于Nrd1-Nab3-Sen1蛋白复合物结合到新生的RNA上是至关重要的^[96-98]。

3 酿酒酵母终止子的人工设计与合成

酿酒酵母可以利用自身有效的同源重组在体内进行遗传电路或合成途径的组装，但当外源基因序列与酵母基因组序列重复或高度相似时，会给多基因装配带来问题^[99]。大多数天然终止子的序列较长，作为元件使用时与酵母基因组同源重组的风险较大，可能会导致体内组装构建物中重复序列的重排，在构建大型遗传回路或途径时较为困难，同时过长或太复杂的终止子也会影响异源基因 mRNA 的稳定性和翻译效率，降低表达水平^[100]。为了避免这些不足，终止子工程应运而生。终止子设计的基本原则是，采用最少元素设计，将功能元件的最佳序列组合在一起，对天然终止子序列进行简化，合成人工终止子，不仅使其具有与天然终止子相同的效应，由于其与酵母基因组几乎没有同源性，大大降低了同源重组率，还能大幅度缩短终止子长度，减轻质粒载体和菌株代谢负荷^[101]。

终止子设计是沿着相对较短的线性 DNA 进行模块化组合的，可以创建高度精确的基因表达模式。从头合成终止子的设计将提供比天然终止子更大的优势，就像合成启动子可以胜过天然启动子一样，合成终止子可能同时影响多个 mRNA 特性，即多聚腺苷酸化水平和 3'-UTR 区域的结构。为了构建一系列合成的终止子，可从基础元件、间隔区、二级结构、GC 含量等方面设计（图 3）。Curran 等^[102-103]基于构成终止子结构的基础元件，设计出 30 个短的、合成长度为 35~70 bp 的人工终止子，与常用的 CYC1 终止子相比，合成的短终止子更能提高 mRNA 的稳定性和增加蛋白质产量，其中人工终止子最高使荧光蛋白输出增加 3.7 倍，转录水平增加 4.4 倍，并且合成的终止子在酿酒酵母和解脂耶氏酵母中都具有很高的活性，证明了这些设计理念可在多种酵母菌种中转移。

表达增强型终止子使酿酒酵母基因表达效率比对照提高了 11 倍，与不使用终止子情况相比提高了 35 倍，为今后终止子人工设计提供了理论依据和设计规则：如荧光蛋白的表达量与效率元件的序列长度成正比；位置元件和 poly(A) 位点对荧光蛋白的表达量没有太大影响^[104-105]。本课题组在优化效率元件、位置元件和 poly(A) 位点基础方面，进

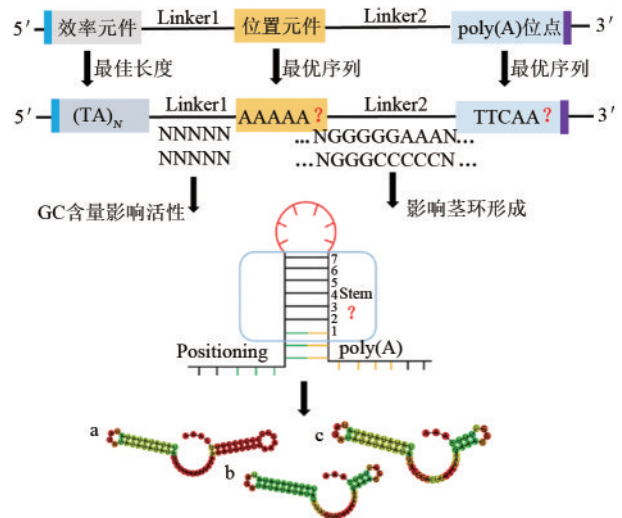


图3 酵母终止子设计的思路

Fig. 3 The strategy for yeast terminators design

(a, b, c 表示用 RNA fold 软件呈现出不同的茎环结构)

(a, b, c indicate different stem-loop structures presented by RNA fold software)

一步探讨了间隔区序列对终止子活性的贡献。在 Guo 首次描述定义酵母终止所需最小元素集的基础上，通过构建 266 个长度约 60 bp 的人工终止子文库，初步发现了一些规律：终止子活性随效率元件与位置元件间 Linker 1 序列 GC 含量的升高而降低，且随 Linker 1 序列中 T 的增加而增加；Linker 1 序列 GC 含量对荧光蛋白表达量的影响要大于 Linker 2 序列；Linker 2 序列构成的茎环对不同活性终止子具有不同程度的影响，降低弱、中等强度终止子的茎长有利于提高 mRNA 表达量和蛋白质产量^[15, 106]。这些研究充分证明终止子的活性是可以调节可以控制的，更短、最小序列的终止子可能被编入未来基因调控元件的设计和预测模型中，也将为理解终止子在基因表达调控中的作用提供重要信息。表 1 列举了常用酵母终止子的相关信息。

4 终止子在酵母途径精细调控中的应用

尽管利用强启动子控制途径酶的表达是代谢工程和合成生物学中常用的调控方法，但随着对转录终止过程的逐步解析，终止控制已经受到越来越多的关注^[107]。由于终止子有助于 mRNA 稳定，将天然终止子用于基因表达盒构建是构建外

表1 常用酵母终止子的信息

Tab. 1 properties of commonly used yeast terminators					
终止子类型	名称	FI值	活性	参考文献	
天然	IRS4t	1.3501	弱	[30]	
	DNM1t	0.6579	弱	[30]	
	NFT1t	0.1944	弱	[30]	
	HOG1t	3.3178	强	[33]	
	SSD1t	3.2127	强	[33]	
	TPS1t	3.0941	强	[33]	
	ATP5t	1.9912	中	[33]	
	CYC1t	1.7559	中	[33]	
	SIR2t	1.6812	中	[33]	
	PGK1t	1.5185	弱	[33]	
	TDH3t	1.4914	弱	[33]	
	SLX5t	1.3802	弱	[33]	
	人工	T-Guo1	2.2000		[13,27]
		T0-T10	0.2~2.4400		[28]
Tsynth1-30		0.03~3.7000		[27]	
T-1316		3.5270	强	[106]	
T-1299		3.5124	强	[106]	
T-1281		3.4866	强	[106]	
T-195		2.9325	中	[106]	
T-154		2.9370	中	[106]	
T-a9		2.9405	中	[106]	
T-509		2.6149	弱	[106]	
T-414		2.4048	弱	[106]	
T-d11	2.3648	弱	[106]		

源途径的必然选择^[108-109]。而使用合成的人工终止子可以更加理性地调控mRNA的半衰期,减少或增加蛋白质产生^[110],因此通过选择合适活性的终止子可以对代谢途径进行精细调控^[111-112]。利用终止子优化合成途径时,可考虑以下原则:①尽量选择相对较短的终止子,以避免冗余序列带来的干扰;②选择终止子时要同时考虑相应组成型启动子的活性,弱、强元件的搭配可以达到使用高活性启动子的效果;③使用诱导性启动子时,终止子的调控作用将会明显降低,因此只需考虑终止子是否易得、易操作;④若难以判断某一基因对多基因途径的影响时,可优先考虑使用中等活性终止子,既能保证目的基因的有效表达,又能有效避免途径上游基因对下游基因的干扰。例如,本课题组通过优选天然终止子来控制番茄红素合成途径,结合柠檬酸分批补料发酵使酿酒酵母合

成番茄红素的产量获得了大幅提升^[113],在此基础上,利用短的、人工合成的终止子控制番茄红素途径基因的表达,使番茄红素产量又提高了13.0%,并发现在某些情况下中等活性终止子比强终止子更有利于代谢途径表达。当合成终止子用于较长途径的 β -香树脂醇合成时,也表现出了良好的效果,使 β -香树脂醇产量提高了约12倍^[114]。目前,已在酵母中建立了大量的天然终止子文库,同时部分结构优化的人工终止子元件已应用于代谢途径调控中,它们的调控能力较天然终止子有显著提高,在代谢工程中具有极大的潜力。这些实例充分证明了终止子调控技术在控制代谢途径中的重要作用,不仅能够用于调节基因表达效率,还可以有效增强代谢途径中目标产物的产量。

5 结语与展望

合成生物技术突破了生命发生与进化的自然法则,推动了生命科学由解读生命到编写生命的跨越,将在破解资源、能源、健康、环境、安全等重大难题方面提供重要支撑。过去的一段时间里,启动子、终止子等调控元件的研究为提升基因和途径的表达给予了许多贡献。然而,偏离期望的元件功能仍然是导致设计周期多次迭代、遗传改造和途径优化快速发展的严重阻碍。稳定、正交、可预测、可调的元件设计是优化控制元件功能必须满足的要求,控制元件的最小化已成为趋势。迄今为止,人们对终止子结构与功能、作用机理的探索取得了重要进展,新的合成终止子已经为代谢工程和合成生物学应用提供了重要支持。但由于真核细胞终止子受其所在染色质环境的高度调控,对酵母终止子的工程化努力仍然较少。终止子与各类转录终止因子如何识别、识别位点或序列是什么,这些问题仍然是终止子优化设计的限制。因此,有必要进一步制定控制终止子染色质环境的设计规则,开发新技术来预测和设计期望功能的终止子。

为避免野生型酵母染色质环境对终止子研究的干扰,利用人工合成酵母体系研究人工设计终止子的特性和调控机理将会是一种重要的技术选择^[115-116]。另外,新一代高通量测序技术为研究终

止子转录机理注入了巨大的活力,是研究转录机理的新的发展趋势。如紫外交联免疫沉淀测序、染色质免疫沉淀测序技术可为终止子元件与蛋白质的结合靶点提供服务;多聚腺苷酸化位点测序技术将为多聚腺苷酸化反应机理研究发挥积极作用^[117-122]。

另外,巴斯德毕赤酵母、多形汉逊酵母、解脂耶氏酵母等非模式酵母近年来也展现出了优良的工业应用价值,通过构建文库等方法在这些酵母中也筛选到了一些内源终止子^[123-125]。尽管非模式酵母中终止子研究较少,但终止子是重要的合成生物学元件之一,是构建基因表达盒和途径的基本要素,因此非模式酵母中终止子的筛选、人工构建甚至异源终止子的优化等也将会是今后该领域的研究重点。相信通过终止子等元件的逐渐解析和开发,会弥补非模式酵母遗传背景不够清楚、代谢调控复杂性高的限制,必将为非模式酵母合成生物学的发展带来新突破。

参 考 文 献

- [1] 温栾,卢俊南,钟伟,等.合成生物学设计技术[J].中国细胞生物学学报,2019,41(11):2060-2071.
WEN L, LU J N, ZHONG W, et al. Design technology in synthetic biology[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2019, 41(11): 2060-2071.
- [2] 赵禹,赵雅坤,刘士琦,等.非常规酵母的分子遗传学及合成生物学研究进展[J].微生物学报,2020,60(8):1574-1591.
ZHAO Y, ZHAO Y K, LIU S Q, et al. Progress in molecular genetics and synthetic biology of unconventional yeast[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020,60(8):1574-1591.
- [3] 邢玉华,谭俊杰,李玉霞,等.合成生物学的关键技术及应用进展[J].中国医药生物技术,2012,7(5):357-363.
XIN Y H, TAN J J, LI Y X, et al. Key technology and application progress of synthetic biology[J]. Chinese Medical Biotechnology, 2012, 7(5): 357-363.
- [4] 赵国屏.合成生物学:开启生命科学"会聚"研究新时代[J].中国科学院院刊,2018,33(11):1135-1149.
ZHAO G P. Synthetic biology: unsealing the convergence era of life science research[J]. Bulletin of Chinese Academy of Sciences, 2018,33(11): 1135-1149.
- [5] HEIDI R, NICHOLAS M, ALPER H S. The synthetic biology toolbox for tuning gene expression in yeast[J]. FEMS Yeast Research, 2014, 15(1): 1-12.
- [6] FISCHER V, SCHUMACHER K, TORA L, et al. Global role for coactivator complexes in RNA polymerase II transcription[J]. Transcription, 2019, 10(1): 29-36.
- [7] LAWSON M R, BERGER J M. Tuning the sequence specificity of a transcription terminator[J]. Current Genetics, 2019, 65(3): 729-733.
- [8] JEONG S W, LANG W H, REEDER R H. The release element of the yeast polymerase I transcription terminator can function independently of Reb1p. [J]. Molecular & Cellular Biology, 1995, 15(11): 5929-5936.
- [9] JEONG S W, LANG W H, REEDER R H. The yeast transcription terminator for RNA polymerase I is designed to prevent polymerase slippage. [J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(27): 16104-16110
- [10] CHOO K B, WU S M, HUNG L, et al. Effect of vector type, host strains and transcription terminator on heterologous gene expression in yeast[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1986, 140(2): 602-608.
- [11] WITTMANN A, SUESS B. Engineered riboswitches: expanding researchers' toolbox with synthetic RNA regulator[J]. FEBS Letters, 2012, 586(15): 2076-2083.
- [12] BRENT R, PTASHNE M. A bacterial repressor protein or a yeast transcriptional terminator can block upstream activation of a yeast gene[J]. Nature, 1985, 314(5995): 198.
- [13] GUO Z, SHERMAN F. Signals sufficient for 3'-end formation of yeast mRNA[J]. Molecular & Cellular Biology, 1996, 16(6): 2772-2776.
- [14] THOMPSON C M, KOLESKE A J, CHAO D M, et al. A multi-subunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding protein in yeast[J]. Cell, 1993, 73(7): 1361-1375.
- [15] GUO Z, SHERMAN F. 3'-end-forming signals of yeast mRNA[J]. Molecular & Cellular Biology, 1995, 15(11): 5983-5990.
- [16] RYAN K, CALVO O, MANLEY J L. Evidence that polyadenylation factor CPSF-73 is the mRNA 3' processing endonuclease[J]. RNA, 2004, 10(4): 565-573.
- [17] SHI Y S, MANLEY J L. The end of the message: multiple protein-RNA interactions define the mRNA polyadenylation site[J]. Genes & Development, 2015, 29(9): 889-897.
- [18] CHAN S L, HUPPERTZ I, YAO C G, et al. CPSF30 and Wdr33 directly bind to AAUAA in mammalian mRNA 3' processing[J]. Genes & Development, 2014, 28(21): 2370-2380.
- [19] WHITELAW E, PROUDFOOT N. Alpha-thalassaemia caused by a poly(A) site mutation reveals that transcriptional termination is linked to 3' end processing in the human alpha 2 globin gene[J]. The EMBO Journal, 1986, 5(11): 2915-2922.
- [20] GIBBS M D, REEVES R A, ANWAR S, et al. A yeast intron as a translational terminator in a plasmid shuttle vector[J]. FEMS Yeast Research, 2004, 4(6): 573-577.
- [21] DICHTL B. Recognition of polyadenylation sites in yeast pre-mRNAs by cleavage and polyadenylation factor[J]. European Molecular Biology Organization Journal, 2001, 20(12): 3197-3209.

- [22] CHEN S, HYMAN L E. A specific RNA-protein interaction at yeast polyadenylation efficiency elements[J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(21): 4965-4974.
- [23] BROCKMAN J, SINGH P, LIU D, et al. PACdb: PolyA cleavage site and 3'-UTR database[J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(18): 3691-3693.
- [24] KELLER W, MINVIELLE-SEBASTIA L. A comparison of mammalian and yeast pre-mRNA 3'-end processing[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 1997, 9(3): 329-336.
- [25] MACDONALD C C, JOSÉ-LUIS R. Reexamining the polyadenylation signal: were we wrong about AAUAAA? [J]. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 2002, 190(1): 1-8.
- [26] TULLER T, RUPPIN E, KUPIEC M. Properties of untranslated regions of the *S. cerevisiae* genome[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10(1): 391.
- [27] CURRAN K A, MORSE N J, MARKHAM K A, et al. Short synthetic terminators for improved heterologous gene expression in yeast[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(7): 824-832.
- [28] MACPHERSON M, SAKA Y. Short synthetic terminators for assembly of transcription units *in vitro* and stable chromosomal integration in yeast *S. cerevisiae*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(1): 130-138.
- [29] SEOANE S, GUIARD B, RODRÍGUEZ-TORRES A M, et al. Effects of splitting alter native KICYC1 3'-UTR regions on processing: metabolic consequences and biotechnological applications[J]. *Journal of Biotechnology*, 2005, 118(2): 149-156.
- [30] YAMANISHI M, ITO Y, KINTAKA R, et al. A genome-wide activity assessment of terminator regions in *Saccharomyces cerevisiae* provides a 'Terminatome' toolbox[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2013, 2(6): 337-347.
- [31] YAMANISHI M, KATAHIRA S, MATSUYAMA T. TPS1 Terminator increases mRNA and protein yield in a *Saccharomyces cerevisiae* expression system[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2011, 75(11): 2234-2236.
- [32] ITO Y, KITAGAWA T, YAMANISHI M, et al. Enhancement of protein production *via* the strong DIT1 terminator and two RNA-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 197-214.
- [33] WEI L N, WANG Z X, ZHANG G L, et al. Characterization of terminators in *Saccharomyces cerevisiae* and exploration factors affecting their strength[J]. *ChemBioChem*, 2017, 18: 2422-2427.
- [34] KECMAN T, KUŚ K, HEO D H, et al. Elongation/termination factor exchange mediated by PP1 phosphatase orchestrates transcription termination[J]. *Cell Reports*, 2018, 25(1): 259-269.
- [35] CAMBRAY C, GUIMARAES J C, MUTALIK V K, et al. Measurement and modeling of intrinsic transcription terminators[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(9): 5139-5148.
- [36] LEAVITT J M, ALPER H S. Advances and current limitations in transcript-level control of gene expression[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 34(3): 98-104.
- [37] SOUTOURINA J. Transcription regulation by the Mediator complex[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, 19(4): 262-274.
- [38] PORRUA O, LIBRI D. Transcription termination and the control of the transcriptome: why, where and how to stop[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2015, 16(3): 190-202.
- [39] PROUDFOOT N. New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2004, 16(3): 272-278.
- [40] HARLEN K M, CHURCHMAN L S. The code and beyond: transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, 18(4): 263-273.
- [41] STEURER B, JANSSENS R C, GEVERTS B, et al. Live-cell analysis of endogenous GFP-RPB1 uncovers rapid turnover of initiating and promoter-paused RNA polymerase II [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, 115(19): E4368-E4376.
- [42] EATON J D, DAVIDSON L, BAUER D L V, et al. Xrn2 accelerates termination by RNA polymerase II, which is underpinned by CPSF73 activity[J]. *Genes & Development*, 2018, 32(2): 127.
- [43] PUIG S, PÉREZ-ORTÍN J, MATA LLANA E. Transcriptional and structural study of a region of two convergent overlapping yeast genes[J]. *Current Microbiology*, 1999, 39(6): 369-373.
- [44] GRZYBOWSKA E A, WILCZYŃSKA A, SIEDLECKI J A. Regulatory functions of 3'UTRs. [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2001, 288(2): 291-295.
- [45] DICHTL B. Yhh1p/Cft1p directly links poly(A) site recognition and RNA polymerase II transcription termination[J]. *The EMBO Journal*, 2014, 21(15): 4125-4135.
- [46] ITO Y, YAMANISHI M, IKEUCHI A, et al. Characterization of five terminator regions that increase the protein yield of a transgene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 168(4): 486-492.
- [47] CURRAN K A, KARIM A S, GUPTA A, et al. Use of expression-enhancing terminators in *Saccharomyces cerevisiae* to increase mRNA half-life and improve gene expression control for metabolic engineering applications[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 19(Complete): 88-97.
- [48] KELLER W, BIENROTH S, LANG K M, et al. Cleavage and polyadenylation factor CPF specifically interacts with the pre-mRNA 3' processing signal AAUAAA[J]. *The EMBO Journal*, 1991, 10(13): 4241-4249.
- [49] TATOMER D C, ELROD N D, LIANG D, et al. The Integrator complex cleaves nascent mRNAs to attenuate transcription[J]. *Genes & Development*, 2019, 33(21/22): 1525-1538.
- [50] CHIU A C, SUZUKI H I, WU X B, et al. Transcriptional pause sites delineate stable nucleosome-associated premature polyad-

- enylation suppressed by U1 snRNP[J]. *Molecular Cell*, 2018, 69(4): 648-663.e7.
- [51] DEZAZZO J D , IMPERIALE M J . Sequences upstream of AAUAAA influence poly(A) site selection in a complex transcription unit[J]. *Molecular & Cellular Biology*, 1989, 9(11): 4951-4961.
- [52] SHAW G , KAMEN R. A conserved adenine uridine sequence from the 3'untranslated region of granulocyte-monocyte colony stimulating factor messenger RNA mediates selective messenger RNA degradation[J]. *Cell*, 1986, 46: 659-668.
- [53] WENG L , LI Y , XIE X, et al. Poly(A) code analyses reveal key determinants for tissue-specific mRNA alternative polyadenylation[J]. *RNA*, 2016, 22(6): 813-821
- [54] MANDEL D R, TONG L, BAI Y. Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing[J]. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 2007, 65(7/8): 1099-1122.
- [55] CHAN S, CHOI E A, SHI Y. Pre-mRNA 3'-end processing complex assembly and function[J]. *RNA*, 2011, 2(3): 321-335.
- [56] ERIKA L P, JOEL H G, SUSAN D, et al. Ipa1 Is an RNA polymerase II elongation factor that facilitates termination by maintaining levels of the poly(A) site endonuclease Ysh1[J]. *Cell Reports*, 2019, 26(7): 1919-1933.
- [57] TIAN B, MANLEY J L. Alternative cleavage and polyadenylation: the long and short of it[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2013, 38(6): 312-320.
- [58] DAFNE C D G, KENSEI N, MANLEY J L, et al. Mechanisms and consequences of alternative polyadenylation[J]. *Molecular Cell*, 2011, 43(6): 853-866.
- [59] VIPHAKONE N, VOISINET-HAKIL F, MINVIELLE S L. Molecular dissection of mRNA poly(A) tail length control in yeast[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(7): 2418-2433.
- [60] PORRUA O, HOBOR F, BOULAY J, et al. *In vivo* SELEX reveals novel sequence and structural determinants of Nrd1-Nab3-Sen1-dependent transcription termination.[J]. *The EMBO Journal*, 2014, 31(19): 3935-3948.
- [61] SIERECKI E . The Mediator complex and the role of Protein-Protein interactions in the gene regulation machinery[J]. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2020, 99: 20-30.
- [62] LEMAY J F , MARGUERAT S , LAROCHELLE M , et al. The Nrd1-like protein Seb1 coordinates cotranscriptional 3' end processing and polyadenylation site selection[J]. *Genes & Development*, 2016, 30(13): 1558-1572.
- [63] GRZECHNIK P, GDULA M R, PROUDFOOT N J. Pcf11 orchestrates transcription termination pathways in yeast[J]. *Genes & Development*, 2015, 29(8): 849-861.
- [64] NEMEC C M, YANG F, GILMORE J M, et al. Different phosphoisoforms of RNA polymerase II engage the Rtt103 termination factor in a structurally analogous manner[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(20): E3944-E3953.
- [65] LUNDE B M, REICHOW S, KIM M, et al. Cooperative interaction of transcription termination factors with the RNA polymerase II C-terminal domain[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010, 17(10): 1195-1201.
- [66] KUMAR R, REYNOLDS D M, SHEVCHENKO A, et al. Forkhead transcription factors, Fkh1p and Fkh2p, collaborate with Mcm1p to control transcription required for M-phase[J]. *Current Biology*, 2000, 10(15): 896-906.
- [67] ZHANG Z, KLATT A, HENDERSON A J, et al. Transcription termination factor Pcf11 limits the processivity of Pol II on an HIV provirus to repress gene expression[J]. *Genes & Development*, 2007, 21(13): 1609-1614.
- [68] ZHANG Z, GILMOUR D S. Pcf11 is a termination factor in *Drosophila* that dismantles the elongation complex by bridging the CTD of RNA polymerase II to the nascent transcript[J]. *Molecular Cell*, 2006, 21(1): 65-74.
- [69] NOBLE C G , HOLLINGWORTH D , MARTIN S R , et al. Key features of the interaction between Pcf11 CID and RNA polymerase II CTD[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2005, 12(2): 144-151
- [70] ZHANG Z. CTD-dependent dismantling of the RNA polymerase II elongation complex by the pre-mRNA 3'-end processing factor, Pcf11[J]. *Genes & Development*, 2005, 19(13): 1572-1580.
- [71] KAMIENIARZ-GDULA K, GDULA M R, PANSER K, et al. Selective roles of vertebrate PCF11 in premature and full-length transcript termination[J]. *Molecular Cell*, 2019, 74(1): 158-172.e9.
- [72] RAPHAËL H, FRÉDÉRIQUE M, NICOLAS V, et al. An essential role for Clp1 in assembly of polyadenylation complex CF IA and Pol II transcription termination[J]. *Nucleic Acids Research*. 2012, 40(3): 1226-1239.
- [73] LUNDE B M, REICHOW S L, KIM M ,et al. Cooperative interaction of transcription termination factors with the RNA polymerase II C-terminal domain[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010, 17(10): 1195-1201.
- [74] NOBLE C G, BARBARA B, TAYLOR I A. Structure of a nucleotide-bound Clp1-Pcf11 polyadenylation factor[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(1): 87-99.
- [75] SINGH N ,MA Z, GEMMILL T, et al. The Ess1 prolyl isomerase is required for transcription termination of small noncoding RNAs *via* the Nrd1 pathway[J]. *Molecular Cell*, 2009, 36(2): 255-266.
- [76] CHO E- J, KOBOR M S, KIM M, et al. Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain[J]. *Genes & Development*, 2002, 15(24): 3319-3329.
- [77] JONES J C, PHATNANI H P, HAYSTEAD T A, et al. C-termi-

- nal repeat domain kinase I phosphorylates Ser2 and Ser5 of RNA polymerase II C-terminal domain repeats[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(24): 24957-24964.
- [78] OSTAPENKO D, SOLOMON M J. Phosphorylation by cak1 regulates the C-terminal domain kinase Ctk1 in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(10): 3906-3913.
- [79] XIAO T J, HALL H, KIZER K O, et al. Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast[J]. *Genes & Development*, 2003, 17(5): 654-663.
- [80] EATON J D, DAVIDSON L, BAUER D L V, et al. Xrn2 accelerates termination by RNA polymerase II, which is underpinned by CPSF73 activity[J]. *Genes & Development*, 2018, 32(2): 127-139.
- [81] FONG N, BRANNAN K, ERICKSON B, et al. Effects of transcription elongation rate and Xrn2 exonuclease activity on RNA polymerase II termination suggest widespread kinetic competition[J]. *Molecular Cell*, 2015, 60(2): 256-267.
- [82] NICOLAS V, FLORENCE V H, LIONEL M S. Molecular dissection of mRNA poly(A) tail length control in yeast[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(7): 2418-33.
- [83] WEISS E A, GILMARTIN G M, NEVINS J R. Poly(A) site efficiency reflects the stability of complex formation involving the downstream element.[J]. *The EMBO Journal*, 1991, 10(1): 215-219.
- [84] FATICA A, MORLANDO M, BOZZONI I. Yeast snoRNA accumulation relies on a cleavage-dependent/polyadenylation-independent 3' - processing apparatus[J]. *The EMBO Journal*, 2014, 19(22): 6218-6229.
- [85] EGECIOGLU D E, HENRAS A K, CHANFREAU G F. Contributions of Trf4p- and Trf5p-dependent polyadenylation to the processing and degradative functions of the yeast nuclear exosome[J]. *RNA*, 2006, 12(1): 26-32.
- [86] GHAZAL G, GAGNON J, JACQUES P E, et al. Yeast rNase III triggers polyadenylation-independent transcription termination[J]. *Molecular Cell*, 2009, 36(1): 99-109.
- [87] MATA J. Genome-wide mapping of polyadenylation sites in fission yeast reveals widespread alternative polyadenylation[J]. *RNA Biology*, 2013, 10(8): 1407-1414.
- [88] YAMANAKA S, YAMASHITA A, HARIGAYA Y, et al. Importance of polyadenylation in the selective elimination of meiotic mRNAs in growing *S. pombe* cells. [J]. *The EMBO Journal*, 2010, 29(13): 2173-2181.
- [89] MORALES J C, RICHARD P, ROMMEL A, et al. Kub5-Hera, the human Rtt103 homolog, plays dual functional roles in transcription termination and DNA repair[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(8): 4996-5006.
- [90] QIU H, HU C, HINNEBUSCH A G. Phosphorylation of the Pol II CTD by KIN28 enhances BUR1/BUR2 recruitment and Ser2 CTD phosphorylation near promoters[J]. *Molecular Cell*, 2009, 33(6): 752-762.
- [91] MIRNA J, HINZE H, HOLZER H. Inactivation of Yeast Enzymes by proteinase A and B and carboxypeptidase Y from yeast[J]. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 1976, 357(1): 735-740.
- [92] HOUSELEY J, RUBBI L, GRUNSTEIN M, et al. A ncRNA modulates histone modification and mRNA induction in the yeast GAL gene cluster[J]. *Molecular Cell*, 2008, 32(5): 685-695.
- [93] STEVEN P, MARCIN G. FRACZEK, JIAN WU, et al. A resource for functional profiling of noncoding RNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *RNA*, 2017, 23(8): 1166-1171.
- [94] RUSSO P, SHERMAN F. Transcription terminates near the poly(A) site in the CYC1 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(21): 8348-8352.
- [95] EMBO R. Yeast Trf5p is a nuclear poly(A) polymerase[J]. *The EMBO Reports*, 2006, 7(2): 205-211.
- [96] CARROLL K L, PRADHAN D A, GRANER J A, et al. Identification of cis elements directing termination of yeast nonpolyadenylated snoRNA transcripts[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(14): 6241-6252.
- [97] WILSON S M. Characterization of nuclear polyadenylated RNA-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1994, 127(5): 1173-1184.
- [98] STEINMETZ E J, CONRAD N K, BROW D A, et al. RNA-binding protein Nrd1 directs poly(A)-independent 3'-end formation of RNA polymerase II transcripts[J]. *Nature*, 2001, 413(6853): 327-331.
- [99] ZHANG W, LIU H, LI X, et al. Production of naringenin from D-xylose with co-culture of *E. coli* and *S. cerevisiae*[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2017, 17: 1021-1029.
- [100] LIAN J, SI T, NAIR N U, ZHAO H. Design and construction of acetyl-CoA overproducing *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 24: 139-149.
- [101] RENDA B A, HAMMERLING M J, BARRICK J E. Engineering reduced evolutionary potential for synthetic biology[J]. *Molecular Biosystems*, 2014, 10(7): 1668-1678.
- [102] CURRAN K A, KARIM A S, GUPTA A, et al. Use of expression-enhancing terminators in *Saccharomyces cerevisiae* to increase mRNA half-life and improve gene expression control for metabolic engineering applications[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 19: 88-97.
- [103] LEBER C, SILVA N A D. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of short chain fatty acids[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2014, 111(2).
- [104] ITO Y, YAMANISHI M, IKEUCHI A, et al. Combinatorial screening for transgenic yeasts with high cellulase activities in combination with a tunable expression system[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144870.

- [105] CHEN Y J, LIU P, NIELSEN A A K, et al. Characterization of 582 natural and synthetic terminators and quantification of their design constraints[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(7): 659-664.
- [106] WANG Z X, WEI L N, SHENG Y, et al. Yeast synthetic terminators: fine regulation of strength through linker sequences[J]. *ChemBioChem*, 2019, 20(18): 2383-2389.
- [107] CHEN Y, XIAO W H, WANG Y, et al. Lycopene overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* through combining pathway engineering with host engineering[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 113.
- [108] JOSEPH V G, ZARMIK M, XIAO C F, et al. Global analysis of mRNA isoform half-lives reveals stabilizing and destabilizing elements in yeast[J]. *Cell*, 2014, 156(4): 812-824.
- [109] MISCHO H E, PROUDFOOT N J. Disengaging polymerase: terminating RNA polymerase II transcription in *budding yeast*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 2013, 1829(1): 174-185.
- [110] LIAN J Z, SI T, NAIR N U, et al. Design and construction of acetyl-CoA overproducing *Saccharomyces cerevisiae* strains. [J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 24: 139-149.
- [111] DA SILVA N A, SRIKRISHNAN S. Introduction and expression of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2012, 12(2): 197-214.
- [112] HONG S P, SEIP J, WALTERS P D, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* to express secretory invertase with strong FBA1N promoter[J]. *Yeast*, 2012, 29(2): 59-72.
- [113] LI X, WANG Z X, ZHANG G I, et al. Improving lycopene production in *Saccharomyces cerevisiae* through optimizing pathway and chassis metabolism[J]. *Chemical Engineering Science*, 2019, 193: 364-369.
- [114] AHMED M S, IKRAM S, RASOOL A, et al. Design and construction of short synthetic terminators for β -amylin production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2019, 146: 105-116.
- [115] XIE Z X, LIU D, LI B Z, et al. Design and chemical synthesis of eukaryotic chromosomes[J]. *Chemical Society Reviews*, 2017, 46(23): 7191-7207.
- [116] SONG H, DING M Z, JIA X Q, et al. Synthetic microbial consortia: from systematic analysis to construction and applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(20): 6954-6981.
- [117] ZHANG Y, GU L F, HOU Y F, et al. Integrative genome-wide analysis reveals HLP1, a novel RNA-binding protein, regulates plant flowering by targeting alternative polyadenylation[J]. *Cell Research*, 2015, 25(7): 864-876.
- [118] ZHANG X, ZUO X, YANG B, et al. MicroRNA directly enhances mitochondrial translation during muscle differentiation[J]. *Cell*, 2014, 158(3): 607-619.
- [119] XUE Y C, ZHOU Y, WU T B, et al. Genome-wide analysis of PTB-RNA interactions reveals a strategy used by the general splicing repressor to modulate exon inclusion or skipping[J]. *Molecular Cell*, 2009, 36(6): 996-1006.
- [120] XIAO R, TANG P, YANG B, et al. Nuclear matrix factor hnRNP U/SAF-A exerts a global control of alternative splicing by regulating U2 snRNP maturation[J]. *Molecular Cell*. 2012, 45(5): 656-668.
- [121] FENG S, XU M, LIU F, et al. Reconstruction of the full-length transcriptome atlas using PacBio Iso-Seq provides insight into the alternative splicing in *Gossypium australe*[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 365.
- [122] PICELLI S, FARIDANI O R, BJÖRKLUND A K, et al. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2[J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(1): 171-181.
- [123] PRIELHOFER R, BARRERO J J, STEUER S, et al. GoldenPICS: a Golden Gate-derived modular cloning system for applied synthetic biology in the yeast *Pichia pastoris*[J]. *BMC Systems Biology*, 2017, 11(1): 123.
- [124] SARAYA R, KRIKKEN A M, VEENHUIS M, et al. Novel genetic tools for *Hansenula polymorpha*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2012, 12(3): 271-278.
- [125] LARROUDE M, ROSSIGNOL T, NICAUD J M, et al. Synthetic biology tools for engineering *Yarrowia lipolytica*[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(8): 2150-2164.



通讯作者:张根林(1981—),男,博士,教授,研究方向为酵母代谢工程。
E-mail:zhgl_food@sina.com



第一作者:盛月(1994—),女,博士研究生,研究方向为酵母代谢工程。
E-mail:syue_biol@163.com