

甲醇营养型酵母表达外源蛋白的特点及策略

范 乔* 刘宏迪

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词 甲醇营养型酵母, 乙醇氧化酶启动子, 蛋白表达, 过氧化物酶体

分类号 Q753 **文献标识码** C **文章编号** 0253-2654(1999)-04-0304-04

酵母作为一类外源基因的表达系统具有很多优点。它们属于单细胞生物,因而保留了细菌易于操作和生长快速的特点;另一方面,酵母具真核生物的亚细胞结构,故具有糖基化、脂肪酰化、蛋白质磷酸化等翻译后修饰功能。大部分重组蛋白的表达都是以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)作为宿主系统的,它的遗传背景及生理特性研究得较透彻。然而,*S. cerevisiae*表达重组蛋白有其局限性:如产量通常很低,自我复制表达型载体在细胞传代中不稳定,外源糖蛋白的过糖基化作用等。

近年来,随着研究的深入,人们用其它的酵母菌株构建了高效稳定的外源基因表达体系,其中以甲醇营养型酵母研究最广。它们是70年代初在研究利用甲醇为单一碳源和能量来源产生单细胞蛋白的过程中分离得到的,它们是克雷布特里阴性(Crabtree negative),对发酵过程中产生的乙醇具有耐受性,因而发酵密度可高达100g干细胞/L^[1],长期行之有效的工业发酵模式和经验使得外源蛋白的生产安全、稳定。这些菌株分为四类:毕赤酵母属(*Pichia*),汉逊酵母属(*Hansenula*),念珠菌属(*Candida*)以及球拟酵母属(*Torulopsis*),以下将简述外源蛋白表达体系巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)和多形汉逊酵母(*H. polymorpha*)表达外源蛋白的特点及提高表达量的策略。

1 转化系统

外源蛋白表达体系的构建首先需要成功的转

化系统,它包括3个部分:有效的宿主菌、带有筛选标记的表达载体、DNA导入宿主细胞的可行性。进一步还应考虑当转化DNA进入细胞之后是与宿主染色体发生重组,还是独立复制。另外,载体的稳定性和拷贝数也是值得考虑的重要因素。

最常使用的选择性标记是某些氨基酸或核苷酸合成酶系基因。相应的营养缺陷型菌株包括亮氨酸缺陷型 $leu2^-$ 、色氨酸缺陷型 $trp1^-$ 、尿嘧啶缺陷型 $ura3^-$ 及组氨酸缺陷型 $His4^-$ 等。对于野生型宿主菌株通常采用抗性标记如G418的进行筛选。

1985年,Cregg等首次报道利用 $CaCl_2$ -聚乙二醇介导的原生质体转化法成功地将带有 $His4^-$ 选择标记的质粒转入*P. pastoris*组氨酸缺陷性菌株GS115($His4^-$),转化效率达 10^5 转化子/ μg ^[2]。在最早转化*H. polymorpha*的报道中是以LEU2和URA3为筛选标记的,采用的方法是原生质体转化法、 $LiCl$ 或 Li_2SO_4 处理细胞、DMSO和甘油处理冰冻细胞,转化效率可达 10^3 转化子/ μg ^[3]。1994,Faber等发现用电击转化酵母细胞非常有效,并且线状DNA转化频率高于环状DNA,但在细胞内环状DNA依然存在,这表明酵母细胞内可发生断裂双链的修复作用^[4]。

* 现中国科学院生物物理研究所

1998-06-26收稿,1998-08-16修回,

P.pastoris 和 *H.polymorpha* 均无内源性载体,外源基因一般整合到宿主染色体基因组上表达目的蛋白,整合表达的优点在于其稳定性和产生多拷贝基因。带有ARS的表达载体能大大提高 *P.pastoris* 和 *H.polymorpha* 的转化效率,ARS载体在 *P.pastoris* 中的拷贝数低,不稳定,且易发生非同源性整合^[5]。对于 *H.polymorpha*, 2.2kb 来自于 *S.cerevisiae* 的 LEU2 可提高载体的拷贝数。当含有ARS载体的重组菌株 *H.polymorpha* 在非选择培养基中生长 50~100 代,外源基因可以非同源整合到染色体 DNA 上^[6]。

2 外源基因的表达

P.pastoris 和 *H.polymorpha* 表达外源基因的优势之一在于 *S.cerevisiae* 无法与之相比的强调控启动子——乙醇氧化酶(AOX1)启动子和甲醇氧化酶(MOX)启动子。甲醇营养型酵母能利用甲醇分解为甲醛和过氧化氢,在此反应中参与的酶类对 *P.pastoris* 来说是乙醇氧化酶(AOX1, AOX2)和二羟丙酮合成酶(DHAS),其中 AOX2 的表达量比 AOX1 低得多;对于 *H.polymorpha* 主要是甲醇氧化酶(MOX)和 DHAS。以甲醇为唯一碳源和能源时, AOX 和 MOX 增至细胞总蛋白的 35%~40%^[7]。AOX 和 MOX 启动子都受甲醇诱导和葡萄糖或甘油的抑制。AOX 的表达受甲醇的严格控制,而对于 *H.polymorpha*, 当培养基中存在少量甘油或葡萄糖时, MOX 仍可表达,占最大量表达的 20%^[8]。

2.1 胞内表达: 对于通常在胞浆中表达或不含有二硫键的外源蛋白,可选择胞内表达。甲醇营养型酵母的细胞内广泛存在特异性细胞分隔—过氧化物酶体(Peroxisomes)。过氧化物酶体可以作为储存表达的外源蛋白的场所,特别是对于那些易降解不稳定的蛋白。甲醇代谢的关键酶,如 AOX, DHAS 和过氧化氢酶(Catalase)都定位于该细胞器内。在甲醇营养型酵母菌株中,过氧化物酶体的增殖受外界环境的诱导。当以葡萄糖为碳源时,仅有一个或很少几个过氧化物酶体存在;而依赖甲醇生长时,过氧化物酶体占细胞总体积的 80%^[9]。

甲醇营养型酵母能有效的表达膜蛋白。膜蛋白的表达需要复杂的翻译后修饰,并且与别的蛋白作用才能形成正确的构象,最终引导至膜,如与分子伴侣作用,因而膜蛋白难以在外源细胞中表达。人们发现 *H.polymorpha* 在含有油酸盐(Oleate)的培养基上生长能大大促进过氧化物酶体的增殖,膜上仅含有极少量

蛋白。这些膜为天然外源膜蛋白的积累提供了很好的场所,外源蛋白与可切割的过氧化物酶体靶信号(PTS)序列融合,被引导至过氧化物酶体膜上,大量积累^[10]。后来在甲醇营养型酵母中不但表达了同源性接近的真菌和植物的膜蛋白,还表达了人的膜蛋白,如肾上腺素能的 β -受体(β -adrenergic receptor),多巴胺受体(receptor for dopamine)等^[11]。

2.2 胞外分泌: 甲醇营养型酵母自身分泌的蛋白很少,因而胞外表达有利于蛋白质的提取和纯化,同时有助于蛋白产物通过分泌途径形成有活性的构象和表达对细胞有毒性的蛋白。

利用自身信号肽与酵母信号肽表达外源蛋白都有成功表达的报道。用自身的信号肽在 *P.pastoris* 中表达成功的例子如人血清白蛋白(HSA)^[12]和牛的凝乳酶(Rennin)^[13]等。酵母信号肽主要来自于磷酸酶(Pho)、转化酶(Invertase)和 α -因子,其中 α -因子信号肽使用得最广。利用 α -因子信号肽在 *P.pastoris* 中分泌表达了单链 FV 抗体片段(Single-chain FV antibody fragments)^[14]、 β -淀粉蛋白片段(a fragment of amyloid β -protein)^[15]等;在 *H.polymorpha* 中表达的乙肝表面抗原(HBsAg)^[16]等。构建 α -因子信号肽融合基因时,需保留 Kex2 蛋白酶切割位点附近的谷氨酸-丙氨酸(Glu Ala)间隔区。Glu Ala 的存在会避免错误切割的发生。

蛋白质的糖基化链参与细胞识别,激素受体结合,蛋白质定位及宿主-微生物间相互作用,糖基化具组织和细胞特异性。蛋白糖链的剪切在高尔基体中进行。*S.cerevisiae* 缺乏甘露糖酶,对表达的外源糖蛋白不进行剪切,相反,还会加上高达 75 个之多的甘露糖残基,并含有许多侧链,这就产生了过糖基化作用(hyperglycosylation)。过糖基化作用阻遏蛋白与抗体的反应活性,而且,出现在外链的大量 α -1,3-甘露糖使蛋白呈免疫原性,因而该表达糖蛋白不能用于治疗。1987, Tschoop 研究了 *P.pastoris* 外泌的糖蛋白,发现其修饰糖链的平均长度为 8~14 甘露糖,而 *S.cerevisiae* 大于 40。另外, *P.pastoris* 分泌蛋白的外链不含 α -1,3-甘露糖,避免了象 *S.cerevisiae* 一样的免疫原性的问题^[17]。有报道在 *H.polymorpha* 中表达的 α -半乳糖苷酶仍被过糖基化修饰。因此,选择宿主系统时应全面考虑目的蛋白糖基化是否必要和表达体系的修饰特点。

由于甲醇营养型酵母能进行高密度发酵,因而蛋白酶的浓度也随之大大提高,影响外泌表达蛋白的产量。在 *P.pastoris* 中,为减少外源蛋白的降解,可调节 pH 值在 2.8~6.5 之间;加入酪蛋白氨基酸或酵母脲;利用蛋白水解缺陷性的菌株也能提高产物稳定性,在 pH 为 3.0 且加入酪蛋白氨基酸时,鼠的表皮生长因子(mEGF)表达最有利^[18]。

3 外源基因表达的策略

影响外源基因表达的因素很多。对于 *P.pastoris* 外源基因不同的整合方式产生了两种表型。当在宿主细胞染色体 AOX1 位点发生双交换取代时,乙醇氧化酶仅靠 AOX2 表达,转化菌株在甲醇营养源中生长缓慢为 Mut^s型,该重组菌株需氧量低。若外源基因在 AOX1 或 HIS4 位点发生单交换插入,则 AOX1 不受影响,菌株在甲醇培养基上正常生长为 Mut⁻。Mut^s和 Mut⁻菌株都有成功表达外源蛋白的报道不过,对于胞内表达而言,最好使用 Mut^s,以减少乙醇氧化酶的含量,因而有利于外源蛋白的提取。

外源基因整合拷贝数的增加可以大大提高目的蛋白的表达。现有 3 种方法可得到多拷贝外源基因的重组菌株,一是从转化子中直接杂交筛选含多拷贝基因的克隆。表达水平上可通过免疫杂交筛选,SDS-PAGE 电泳,基因水平可借助于原位菌落点杂交。二是构建含有多个外源基因序列的重组载体。三是用 G418 抗性基因来筛选多拷贝基因,抗性越强表明外源基因整合的拷贝数越高。

外源基因 A + T 组成对基因的转录有一定的影响。A + T 含量高的外源基因在 *P.pastoris* 中会发生转录提前终止,人免疫缺陷病毒(HIV-gp120)基因的一段序列 5'-ATTATTTTATAAA 在 *P.pastoris* 中表达时转录受阻,当改变成 5'-TTTCTTCTACAAG,则阻遏消失^[19]。因为有许多未知的富含 AT 的区域可能会终止转录,常用的手段是改变目的基因编码碱基使 A + T 含量为 30%~50%。当合成外源基因时,应使用宿主细胞偏爱的密码子。

对于那些表达量低,甚至不可检测的外源蛋白,可以选择用融合蛋白的方式进行表达,在 N 端加上稳定的蛋白质,如人的过氧化物歧化酶(human superoxide dismutase),人的 γ 干扰素(human γ -interferon)等。但这常常也会导致产生不溶性的产物并需要体内再次的

剪切和折叠过程。后来人们发现用泛肽(ubiquitin)可以克服重组蛋白需再次折叠的问题。泛肽前导序列的切割是通过酵母体内的水解酶作用的,除了 N 端为脯氨酸的外源蛋白之外,别的蛋白与泛肽的结合位点都能被水解酶有效切割。在胞浆中不稳定的表达蛋白与泛肽形成融合蛋白后能提高其产量和稳定性^[20]。

越来越多外源蛋白在甲醇营养型酵母中成功表达的例子表明它们是一类具有潜力的表达体系。与 *S.cerevisiae* 相比,它们的表达量高得多,自身分泌的蛋白少因而有利于提取,扩大发酵规模时,在甲醇营养型酵母表达的外源蛋白不会受到影响。另外它们还具备安全方便的生产模式,这就使得在工业生产中具有很好的商业前景。利用甲醇营养型酵母生产商品化的基因工程药物也指日可待。

参 考 文 献

- [1] Romanos M A, Scorer C A, Clare J J. *Yeast*, 1992, 8:423~488.
- [2] James M C, Kevin J B, Anita Y H *et al.* *Mol Cell Bio*, 1985,5(12): 3376~3385.
- [3] Roggenkamp R, Hansen H, Eckart M *et al.* *Mol Gen Genet*, 1986,202: 302~308.
- [4] Faber K N, Haima P, Harder W *et al.* *Curr. Genet*, 1994, 25:305~310.
- [5] Sreekrishna K, Tschopp J F, Fuke M. *Gene*,1987, 59: 115~125.
- [6] Veale R A, Giusseppe MLF, Eijk HMJ *et al.* *Yeast*, 1992, 8:361~372.
- [7] Sreekrishna K, Nelles L, Potenz R *et al.* *Biochemistry*, 1989, 28:4117~4125.
- [8] Janowicz Z A, Melber K, Merckelbach a *et al.* *Yeast*,1991,7:431~443.
- [9] Veenhuis M, Harder W. *The Yeast*, 2nd. London: Academic Press, 1991, 601~653.
- [10] Veenhuis M, Kram A M, Kunau W H *et al.* *Yeast*, 1990, 6: 511~519.
- [11] Grisshammer R, Tate C G. *Rev Biophys*, 1995, 28: 315~442.
- [12] Barr K A, Hopkins S S, Sreekrishna K. *Pharm Eng*, 1992, 12:48~51.
- [13] Digan M E, Lair S V, Brierly R A *et al.* *Bio/Technology*, 1989, 7:160~164.
- [14] Ridder R, Schmitz R, Legay Y F *et al.* *Biotechnology*1995, 13:255~260.

(下转第 282 页)