

文章编号:1673-1689(2005)03-0106-05



甲基营养酵母在生产重组蛋白中的应用

陆兆新, 刘战民, 吕凤霞, 别小妹, 赵海珍

(南京农业大学 食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要:对真核表达系统 *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis* 和 *Pichia* 甲基营养酵母的生理特性、基因整合、糖基化、载体设计及其在生产与研究中的应用进行了综述,表明该系统表达外源基因具有经济合理、安全可靠、表达蛋白可以翻译后修饰等优点,是一类极具发展潜力和广泛应用的真核表达系统。

关键词: 甲基营养酵母; 外源基因表达; 真核表达系统

中图分类号: Q 936

文献标识码: A

Application of Methylotrophic Yeast for Heterologous Protein Production

LU Zhao-xin, LIU Zhan-min, LU Feng-xia, BIE Xiao-mei, ZHAO Hai-zhen

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Some *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis* and *Pichia* species of methylotrophic yeast have the growth capacity with methanol as sole carbon source. The heterologous gene expression systems are characterized with the economics, safety, authenticity and posttranslation modification, and they will have been developed in good potential and applied widely in many areas.

Key words: methylotrophic yeast; heterologous expression; eukaryotic expression

随着系统基因组学日新月异地发展,人们迫切寻求合适的表达系统用于分析和鉴定新的基因。表达系统的选择取决于系统本身的特点和表达产物的应用前景,主要考虑是否经济合理和安全可靠,如酶制品和药品的生产。理想的表达系统是二者有机结合,即生产成本低,生产工艺安全可靠,表达产物可被修饰加工。

依据此标准,酵母比原核和其他真核系统有着明显的优势,它不产生热原质、致病物和病毒包涵体,完全满足安全要求,而且包括甲基营养酵母在内的真核酵母能对分泌蛋白质进行修饰加工,如糖

基化等;同时具有易于基因操作和可在简单培养基条件下高密度培养的特点。

只有少数的 *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis* 和 *Pichia* 酵母种能以甲醇为惟一碳源进行生长,它们是从土壤、腐烂的水果和昆虫的消化道中分离出来的,最初是生产单细胞蛋白的最佳微生物。一些甲基营养酵母已经成为生物技术领域强有力的表达系统,当前用于酶工业和制药领域中胰岛素样生长因子(IGF)、乙肝疫苗、人血清蛋白(HSA)和植酸酶等的生产^[1,2]。

收稿日期:2004-01-06; 修回日期:2005-01-13.

作者简介:陆兆新(1957-),男,江苏无锡人,教授,博士生导师。

1 甲基营养酵母生理特性

酵母亚科的 *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* 和 *Torulopsis* 属中的兼性甲基营养酵母种有一个特定的甲醇利用途径. 反应开始在特定的微体过氧化物体中进行, 随后发生在细胞质中. 甲醇在过氧化物体中由专一的氧化酶氧化成甲醛和氢过氧化物, 氢过氧化物被过氧化物酶催化生成水和氧分子. 以上4个酵母种的氧化酶基因已被鉴定和克隆成功, 其中 *P. pastoris* 含有醇氧化酶基因 AOX1 和 AOX2^[3], *P. methanolica* 含有乙醇利用基因 AUG2, 分别带有重要的醇氧化酶 AOX1 和 AUG, 而 *H. polymorpha* 有甲醇氧化酶基因 MOX, *C. boidinii* 有乙醇氧化酶基因 AOD1^[4].

甲基营养酵母在不同的碳源中生长会导致胞内蛋白质积累方式的不同. 在甲醇中生长时, 细胞中积累了大量的甲醇代谢途径中的关键酶, 特别是两个脱氢酶和二羟基丙酮合成酶(DHAS). 在甲醇连续培养时, 乙醇氧化酶占细胞总蛋白质量分数30%, 甲醇脱氢酶(FMDH)和二羟基丙酮合成酶占20%, 因而这些关键酶的合成受到培养基中碳源的调控. 在产酶量很高的情况下, 大型过氧化物体和甲醇代谢起始过程的细胞间隙占到细胞体积的80%.

甲基营养酵母中酶的合成是处于转录水平的调控, 许多基因的强启动子作为外源基因表达的极具吸引力的调控元件被组合起来, 特别是 AOX1 (*P. pastoris*) 的启动子、AUG1 (*P. methanolia*)、AOD1 (*C. boidinii*) 和 MOX (*H. polymorpha*) 的启动子^[5], 此外还有 *P. pastoris* 的甲醛脱氢酶基因 (FLD1) 启动子、*H. polymorpha* 和 *C. boidinii* 中的 DHAS 和 FMDH 的启动子^[6~8]. 这些启动子在各自的甲基营养酵母宿主菌中起到调控外源基因表达的作用, 当酵母合成酶时, 它们对碳源的依赖有着显著的不同. *P. pastoris* 中的 AOX1 和 AUG1 启动子在甲醇存在时具有很高的活性, 而在甘油或葡萄糖适量情况下, 利用 MOX 和 FMD 的 *H. polymorpha* 能大量生产外源蛋白. 在葡萄糖饥饿培养时, 植酸酶产量可达到 13.5 g/L^[9]. *P. pastoris* 的 FLD1 启动子在以硫酸铵为惟一氮源时受甲醇的强烈诱导, 或者在以葡萄糖为惟一碳源时受到甲胺的强烈诱导.

除了这些甲醇代谢基因的启动子之外, 被用于各种不同的甲基营养酵母高效表达外源基因的启动子还有 *P. pastoris* 的 GAP1 启动子和作为 *H.*

polymorpha 的组成性元件的 GAP1 和 PMA1 启动子^[10]. 在 *H. polymorpha* 中可以得到硝化途径基因启动子和 6-磷酸-海藻糖合成酶基因 (TPS1) 启动子^[11]. TPS1 启动子显著特点在于它能使外源蛋白在常温和提高温度时有良好表达.

2 甲基营养酵母表达特性

甲基营养酵母的转化与其他酵母(如酿酒酵母)转化过程相似, 采用电转化法、氯化锂法和添加 PEG 的整细胞法 (whole-cell method). 质粒整合到基因组的特定位置或随机整合. 外源基因一般整合到 *P. pastoris* 的 AOX1, HIS4 或者 *P. methanolia* 的 AUG1 上^[12]. 在多数 *H. polymorpha* 重组菌株中, 外源 DNA 通过定位于环状质粒的 HARS 序列进行随机整合转化^[13], 通过同源重组在 MOX/TRP3 位置的缺失/整合可以获得靶向整合. 其他的靶向序列有 HARS36, LEU2 或 rDNA 基因簇^[10].

H. polymorpha 转化通常产生许多有丝分裂稳定的单拷贝和多拷贝菌株, 其表达盒以“头对尾” (head to tail) 的形式排列. 在 *H. polymorpha* 或酿酒酵母的 URA3 基因存在的情况下, 通过序列通道可以在尿嘧啶营养缺陷型 *H. polymorpha* RB11 菌株中发生随机整合, 进而获得有丝分裂稳定地菌株. 无需使用任何质粒稳定措施, HARS36 核心下游特定序列可以使质粒稳定地整合到 *H. polymorpha* DL-1 菌株的基因组上. 质粒的分配受到酿酒酵母 2 μ 序列的影响. 利用细菌的 APH 与可激发 G418 抗性的缺陷 GAP 的启动子相融合, 可以控制外源基因整合的拷贝数. 一些具有不同选择性标记的质粒可用于选择低拷贝、中拷贝和高拷贝数的整合^[7].

尽管存在 HARS 序列, 质粒整合到 *H. polymorpha* 宿主染色体上可以得到 100 个拷贝数, 利用转化载体携带多个表达盒在 *H. polymorpha* 可以进行几个基因的共表达. 采用这种方法获得的重组菌株可以生产功能性人血红蛋白, 在随后的转化过程中利用不同的选择性基因转移表达盒. 这使得生产复杂结构蛋白质如乙肝疫苗和创建新代谢途径共生产适宜的重组酶成为可能.

酵母菌可以使分泌的蛋白质加上以 N-糖或 O-糖^[14]. 在 N-糖基化过程中, N-糖苷核上只能加上甘露糖, 在 O-糖基化中, 寡糖只能由甘露糖组成, 这与哺乳动物的糖基化中可加上各种糖类, 如半乳糖、N-乙酰半乳糖酰胺和唾液酸等有所不同, 因而酵母表达系统只能用于无糖基化蛋白质或那些不

需哺乳动物类型糖基化的蛋白质的表达. 胰岛素样生长因子在人体内不需进行糖基化, 在 *P. pastoris* 表达时发现有一定程度的 O-糖基化. 与酿酒酵母相比, 甲基营养酵母有着突出的优势, 它们的表达蛋白很少出现焙烤酵母中的过度糖基化, 尽管在 *P. pastoris* 和 *H. polymorpha* 中也出现一些过度糖基化的现象. 此外, 通常在酿酒酵母中以 α -1,3 键加上末端甘露糖, 会引起过敏反应, 在 *P. pastoris* 中则以 α -1,2 键连接末端甘露糖并未发现过敏反应.

甲基营养酵母的载体被整合到各种宿主菌中, 通过随机或同源重组的方法靶 DNA 被整合到基因组的特定位置. 为了有利于整合, 载体结构设计为锚定或缺失序列. 在 *P. pastoris* 和 *P. methanolica* 中整合发生在两个氧化酶基因之一或 *HIS4* 位置上, 在 *H. polymorpha* 中外源 DNA 随机整合或介

导整合到特定位置. 通过缺失/替换整合到 *MOX/TRP3* 位置或靶向到自主复制序列 (*ARS*), *LEU2* 或 *URA3* 基因或 *rDNA* 基因簇上. 通常转化载体含有酵母和细菌基因序列, 载体的细菌部分有 *ori* 和抗生素序列以便于在细菌宿主中繁殖和筛选. 与之相似, 载体的酵母部分含有酵母转化的选择标记. 在 *P. pastoris* 中这种选择序列被设计成 *HIS4* 缺陷型宿主的互补序列, *P. methanolica* 中是 *ADE2* 互补序列, *H. polymorpha* 中是 *LEU2* 和 *URA3* 互补序列, 而且在 *P. pastoris* 和 *H. polymorpha* 中还使用抗 G418 的显性选择性标记. 其他互补序列有 *P. pastoris* 中的 *Zecoin* 抗性标记和 *H. polymorpha* 的福来霉素抗性标记^[15,16]. 甲基营养酵母表达载体见表 1^[17], 宿主菌见表 2^[18].

表 1 甲基营养酵母的表达载体
Tab. 1 Expression vectors of methylotrophic yeast

质 粒	表达盒	选择性标记	靶向序列
<i>Candida boidinii</i>			
pMAG10	AOD1 启动子; AOD1 启动子	URA3	URA3
<i>Pichia methanolica</i>			
pCZR134	AUG1 启动子	ADE2	AUG1
<i>Pichia pastoris</i>			
pGAPZ	GAP 启动子; AOX1 启动子	ZEOCIN ^R	
pPIC9k	AOX1 启动子; AOX1 启动子	HIS4; kanamycin ^R	AOX1
<i>Hansenula polymorpha</i>			
pMPT121*	MOX 启动子; MOX 启动子	URA3	随机整合
pFPMT121*	FMD 启动子; MOX 启动子	URA3	随机整合
pC11-TPS*	TPS 启动子	URA3	随机整合

注: * 标记的质粒含有复制序列 *HARS*.

有些分泌引导序列能介导酵母翻译产物的分泌, 所有甲基营养酵母使用酿酒酵母的 *MFaI* 引导蛋白分泌. 在 *P. pastoris* 和 *H. polymorpha* 中也采用 *PHO1*, 而 *Carcinus maenas* 的编码高血糖生长素基因 (*CHH*) 和 *Schwanniomyce occidentalis* 的 *GAM1* 的前导序列用于 *H. polymorpha* 中分泌水蛭素的生产素^[19].

重组 *H. polymorpha* 菌株的培养基通常以简单的合成培养基为基础, 含有微量金属离子和充足的氮源以供细胞生长和基因表达的需要. 最适宜的碳源必须以适宜质量浓度添加, 因为碳源补加的不同, 发酵模式随之变化. 甘油、甲醇、葡萄糖及相互配伍的混合碳源也应有所选择. 最优的发酵模式取决于外源基因表达的启动子序列 (*FMD* 或 *MOX* 启动子) 和外源基因产物本身因素^[6]. 通过使用不
万方数据

同的碳源和添加物的复杂发酵工艺可以获得高产量的外源蛋白, 整个发酵时间为 80~160 h.

在甲基营养酵母中, 只有 *H. polymorpha* 表达系统利用甲醇途径启动子在无甲醇添加时能够高效表达重组蛋白. 而甲基营养酵母 *P. pastoris* 和 *Candini boidinii* 的甲醇利用启动子只有受到甲醇的诱导, 才能表达外源蛋白.

3 甲基营养酵母应用

越来越多的蛋白由甲基营养酵母生产, 包括植物的、细菌的、人的、酶、抗体、细胞因子、血浆蛋白和生长素等. 介绍几例由 *P. pastoris* 和 *H. polymorpha* 工业化生产的重要蛋白产品.

表 2 外源基因表达的宿主菌
Tab. 2 Host strain of heterologous gene expression

宿主菌	基因型	表现型
<i>Candida boidinii</i>		
Tk62	ura3	Ura ⁻
<i>Hansenula polymorpha</i>		
RB12	ura3	Ura ⁻
RB17	aro7	Tyr ⁻
RC296	ade	Ade ⁻
NCYC495	leu1-1	Leu ⁻
<i>Pichia methanolica</i>		
PMAD11	ade2-11	Ade ⁻
PMAD12	ade2-11aug1△	Ade ⁻ Aug ⁻
PMAD13	ade2-11pep4△prb1△	Ade ⁻ Pep4 ⁻ Prb1 ⁻
<i>Pichia pastoris</i>		
GS115	his4	Mut ⁺ his ⁻
KM71	aox1△::SARG4his4arg4	Mut ⁺ his ⁻
MC100-3	aox1△::SARG4aox2Phis4his4arg4	Mut ⁻ his ⁻
SMD1168	pep4△his4	Mut ⁺ his ⁺ protease

H. polymorpha 生产的重组蛋白包括一些药物^[20~22],如正在临床试验的抗血栓水蛭素和几种已经商品化的乙肝疫苗。*H. polymorpha* 生产的乙肝疫苗表面抗原的亚基 adr 和 adw 是乙肝病毒最重要的血清型表位^[23]。将与 MOX 启动子融合的疾病基因的载体转化 *H. polymorpha* 菌株,获得生产菌株能利用甲醇或甘油为惟一碳源进行发酵。在此发酵过程中,必须添加甲醇以诱导外源蛋白的生产和膜的增值。因为蛋白质沉积在胞内,必须从细胞提取液中进行回收和纯化。经过一系列步骤后,细胞经均质,细胞粗提物中碎片经过沉淀、离心分离,上清液中的乙肝表面抗原进一步经凝胶吸附、离子交换层析、离子和凝胶过滤纯化,最后得到与酵母胞膜装配的外源蛋白组成的高纯度脂蛋白。这种颗粒结构对于刺激免疫应答非常重要,它吸附到氢氧化铝辅助剂上形成疫苗。当前 *H. polymorpha* 生产的 2 种乙肝疫苗已经商品化,它们是 KGCC(韩国)生产的 Hepavax-gene 和 LPC(阿根廷)生产的 AgB。此外,鼠源抗肌氨酸激酶单克隆抗体在 *H. polymorpha* 中也被成功表达^[24]。

工业酶的生产工艺围绕生产效率和成本考虑为中心不断改进。近年来在 *H. polymorpha* 菌株基础上建立了植酸酶的生产工艺。植酸是植物体内磷酸贮存的主要形式,而植酸酶可以催化植酸放出磷酸。向动物饲料中廉价添加植酸酶降解植酸,可为不能利用植酸的猪、鸡等非反刍动物提供完全的磷酸源。生产植酸酶的 *H. polymorpha* 开始在甘油上生长,随致继续以葡萄糖限量添加。以廉价碳源为

培养基的发酵工艺可以得到 13.5 g/L 的分泌蛋白,因而符合饲料添加剂生产的经济要求。

利用基因工程菌生产 HSA 不仅效率高,成本低,而且产物纯度高。因为在人体中清蛋白仅有几十克,所以纯度很重要。在 *P. pastoris* 菌株基础上建立起生产 HSA 的工艺,即在甲醇优化添加量并控制条件使蛋白水解程度最小,可以得到 10 g/L 发酵液的产量^[10]。

H. polymorpha 共表达一定比例的稳定嵌合基因,使之成为生物转化特定底物为有益生物制品的生物催化剂^[25]。近年来培育成功了羟基醋酸盐转化为乙酸盐和乳酸盐转化为丙酮酸盐的生物催化菌株。它的有效转化取决于羟基醋酸盐氧化酶和过氧化氢酶的适宜比例。初始重组菌株利用基因工程整合 30 个拷贝的菠菜羟基醋酸氧化盐基因(GO),随后又整合了 15 个拷贝的酿酒酵母过氧化氢酶 T 基因(CTT1);最终的重组菌株能以最优的比例高效生产这两种酶。进行生物转化时,只需将底物加到适宜条件下发酵后积累了两种酶并经变性处理的重组细胞内即可。在随后生物催化反应中重组细胞至少可被反复利用 25~30 次^[11]。

4 结 语

甲基营养性酵母是外源基因表达的理想系统,无论是酶制剂还是药品生产,这种安全、方便的系统具有工业化生产技术的优势。应用这类酵母技术现已成熟,表达系统的构件在不断补充和更新,其应用领域也在拓宽。

参考文献:

- [1] Cregg J M. Expression in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*[M]. San Diego: Academic, 1999. 157—191.
- [2] 李育阳. 基因表达技术[M]. 北京: 科学技术出版社, 2001.
- [3] Victor Ashin, Yuri Trotsenko. Alcohol oxidase of the methylotrophic yeasts: new findings[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2000, 10 (3): 295—303.
- [4] Raymond CK, Bukowski T, Holderman S D, et al. Development of the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*, for the expression of the 65-kilodalton isolation of human glutamate decarboxylase[J]. *Yeast*, 1998, 14: 11—23.
- [5] Komeda T, Yurimoto H, Kato N, et al. Cis-acting elements sufficient for induction of FDH1 expression by formate in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*[J]. *Mol Gen Genomics*, 2003, 270: 273—280.
- [6] Hiroya Yurimoto, Toshihiro Komeda, Chun Ren Lim, et al. Regulation and evaluation of five methanol-inducible promoters in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1493: 56—63.
- [7] Gilbert S C, van Urk H, Greenfield D M, et al. Increase in copy number of an integrated vector during continuous culture of *Hansenula polymorpha* expressing functional human haemoglobin[J]. *Yeast*, 1994, 10: 1569—1580.
- [8] Anthony Jay Sunga, James M Cregg. The *Pichia pastoris* formaldehyde dehydrogenase gene (FLD1) as a marker for selection of multicopy expression strains of *P. pastoris*[J]. *Gene*, 2004, 330: 39—47.
- [9] Gilbert S C, van Urk H, Greenfield D M, et al. Increase in copy number of an integrated vector during continuous culture of *Hansenula polymorpha* expressing functional human haemoglobin[J]. *Yeast*, 1994, 10: 1569—1580.
- [10] Cox H, Mead D, Sudbery P, et al. Constitutive expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* using the PMA1 promoter[J]. *Yeast*, 2000, 15: 1867—1883.
- [11] Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, et al. High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia* yeast with minimal protease production and activation[J]. *Biosci Biotech*, 2000, 89: 55—61.
- [12] Raymond C K. Recombinant Protein Expression in *Pichia methanolica*[M]. San Diego: Academic, 1999. 193—209.
- [13] Hollenberg CP, Gellissen G. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1997, 8: 554—560.
- [14] Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia Pastoris*[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24: 45—66.
- [15] Vozza L A, Wittwer L, Higgins DR, et al. Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. *Biotechnology*, 1997, 14: 77—81.
- [16] Zurek C, Kubis E, Keup P, et al. Production of two aprotinin variants in *Hansenula polymorpha*[J]. *Process Biochem*, 1996, 1: 679—689.
- [17] Brito N, Perez M D, Perdomo G, et al. A set of *Hansenula polymorpha* integrative vectors to construct lacZ fusions[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 53: 23—29.
- [18] Waterham H R, Digan M E, Koutz P J, et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter[J]. *Gene*, 1997, 186: 37—44.
- [19] Weydemann U, Keup P, Piontek M, et al. High level secretion of hirudin by *hansenula polymorpha*-authentic processing of three different preprohirudins[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, 44: 377—385.
- [20] 叶祥忠, 郭强, 李朝, 等. TPO 模拟肽与人 IgG1Fc 融合蛋白在毕赤酵母中的表达及活性鉴定[J]. 生物工程学报, 2004, 20 (1): 25—29.
- [21] 章扬培, 杨军, 高新, 等. 用基因重组 α -半乳糖苷酶进行 B $\rightarrow$ O 型血改造[J]. 科学通报, 2003, 48(1): 43—47.
- [22] Marija Anhr Lasnik, Vladka Gaberc Porekar, Anton Stalc. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF) expressed by methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. *Eur J Physiol*, 2001, 442 (Suppl 11): R184—R186.
- [23] Gellissen G, Merlber K. Methylotrophic yeasts *Hansenula polymorpha* as production organism for recombinant pharmaceuticals[J]. *Drug Res*, 1996, 46: 943—948.
- [24] Abdel-Salam H A, El-Khamissy T, Enan G A, et al. Expression of mouse antiretin kinase (MAK33) monoclonal antibody in the yeast *Hansenula polymorpha*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 56: 157—164.
- [25] Klabunde J, Diesel A, Waschik D, et al. Single-step cointegration of multiple heterologous genes into the ribosomal DNA of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58: 797—805.

(责任编辑: 杨勇)