



巴斯德毕赤酵母甲醇诱导表达磷脂酶 A₂ 的转录组学分析

王迎政, 喻晓蔚*, 徐岩*

工业生物技术教育部重点实验室, 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

摘要:【目的】基于转录组学技术研究表达磷脂酶 A₂ 的毕赤酵母重组菌在甲醇诱导表达外源蛋白时的基因表达差异, 从而解析外源蛋白高效诱导表达机制, 为进一步工程菌株的改造提供理论支撑。【方法】以一株产磷脂酶(PLA₂)的毕赤酵母为出发菌株, 采用 RNA-Seq 二代测序方法, 研究在甘油培养和甲醇诱导两种条件下, 重组毕赤酵母转录组基因表达差异情况。【结果】重组毕赤酵母中共鉴定到 5225 个转录本。甘油培养与甲醇诱导相比, 共有 857 个基因发生显著变化。依据代谢途径分类, 差异基因集中在核糖体成分、甲醇代谢、磷酸戊糖途径、糖酵解途径、柠檬酸循环、乙醛酸循环以及蛋白质加工过程。【结论】通过分析甲醇诱导前后的差异表达基因, 结果表明碳源改变对胞内代谢会产生全局影响。本研究结果为进一步研究毕赤酵母表达外源蛋白的机制提供了基础。

关键词: 毕赤酵母, 转录组, 甲醇诱导, 甘油培养, 代谢机制

巴斯德毕赤酵母(*Komagataella phaffii* 原命名为 *Pichia pastoris*^[1])是一种高效生产外源蛋白的甲醇营养型酵母, 能以甘油或者甲醇作为唯一碳源和能源, 其中甲醇可作为诱导剂, 诱导醇氧化酶(AOX)启动子表达相关基因, 它兼具大肠杆菌表达系统优势, 同时克服了酿酒酵母表达系统诸多不足。如: 具有强诱导性和强启动性的 AOX 启动子, 适用于外源基因高水平诱导表达; 具有真核生物蛋白质翻译后加工折叠和翻译后修饰机制, 从而使表达出的真核生物蛋白具有生物活性; 胞外蛋白中内源蛋白分泌非常少, 有利于表达产物分离纯

化; 外源基因可整合到酵母染色体上, 避免了外源基因的丢失。

毕赤酵母利用甘油和甲醇作为碳源时, 发酵过程中胞内代谢状态存在一定差异。重组毕赤酵母在甘油培养和甲醇诱导下, 显著性差异基因主要在蛋白酶体、糖基化合成、甲烷代谢、内质网蛋白质加工、不饱和脂肪酸和柠檬酸循环(TCA 循环)等^[2]。毕赤酵母在不含甘油的甲醇诱导培养基中, 甘油代谢相关基因表达量较少^[2]。毕赤酵母在发酵过程中, 环境条件、胞内代谢系统以及外源基因共同决定了胞内的代谢状态。本实验室前

基金项目: 国家自然科学基金(31671799); 江苏省“六大人才高峰”人才项目(NY-010)

*通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918201; E-mail: bioyuxw@aliyun.com

收稿日期: 2017-01-18; 修回日期: 2017-03-30; 网络出版日期: 2017-04-05

期构建了表达磷脂酶基因的毕赤酵母基因重组菌,实现了其高效分泌表达^[3],但是毕赤酵母高水平蛋白表达具体原因和机制还有待进一步深入研究。

RNA-Seq 是基于第二代测序技术(Next-generation sequencing, NGS)的转录组学研究方法,揭示基因组中 RNA 特定时刻的存在和数量的技术^[4]。目前已有从蛋白组学和基因组学研究代谢途径,但是利用转录组有针对性研究代谢途径还处于初期阶段^[6]。在本研究中,结合 RNA-Seq 第二代测序技术,在转录层面获得高表达外源蛋白重组菌株中全部基因表达情况,形成表达谱,并构建关键基因的表达通路;通过生物信息学技术分析基因表达差异,研究细胞表型和功能,全面理解蛋白产生机制,进一步为工程菌株的改造提供理论支撑。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:表达紫红链霉菌磷脂酶 A₂的毕赤酵母菌株 *K. phaffii* GS115/pPIC9K-PLA2 为本实验室构建^[3]。

1.1.2 YPD 平板培养基(g/L):蛋白胨 20.0,无水葡萄糖 20.0,琼脂粉 20.0,酵母提取物 10.0。

1.1.3 种子培养基(g/L):蛋白胨 20.0, YNB 13.4, 酵母提取物 10.0,生物素 4×10^{-4} ,甘油 10.0, pH 6.0 磷酸缓冲液 100.0 mmol/L。

1.1.4 微量元素 PTM1 溶液(g/L):CuSO₄·5H₂O 6.00, Na₂MoO₄·2H₂O 0.20, KI 0.08, ZnSO₄·7H₂O 42.20, MnSO₄·H₂O 3.00, FeSO₄·7H₂O 65.00, Biotin 0.20, H₃BO₃ 0.02, CoCl₂·6H₂O 0.50, H₂SO₄ 5.00 mL/L。

1.1.5 基础盐培养基(g/L):甘油 40, 85% H₃PO₄ 28.70 mL/L, KOH 4.13, K₂SO₄ 18.20, CaSO₄ 0.93, MgSO₄·7H₂O 14.90, 含有 4 mL/L 的微量元素 PTM1 溶液。

1.1.6 补料生长培养液:甘油 500 g/L, 含有微量元素 PTM1 溶液 12 mL/L。

1.1.7 诱导培养液:甲醇溶液, 含有 12 mL/L 的微量元素 PTM1 溶液。

1.2 样本制备方法

1.2.1 培养方法:在无菌环境中挑取 YPD 平板培养基上生长良好的菌落,接种至三角瓶中培养,培养 16–20 h,当 OD₆₀₀ 达到 2–6 时,接种至发酵罐中进行培养。

配置 2.25 L 基础盐培养基,加入 7 L 发酵罐中,121 °C 灭菌 20 min 后,室温冷却,控制空气流量为 2.5 L/min,自动流加 25%氨水将发酵液 pH 控制在 5.5,控制温度 30 °C。

在甘油生长相中,将种子培养基接种至发酵罐中,接种量为 10% (V/V),维持 DO 值在 20%–30%,培养至溶氧 DO 值急剧升高,此时其中甘油已经完全消耗,维持 30 min;在甘油流加相中,流加 50%甘油(W/V, 含 12 mL/L 的 PTM1),调节流加速率控制 DO 维持在 20%–30%,当细胞生长密度 OD₆₀₀ 达到 110,停止补加甘油,维持饥饿状态,让甘油彻底耗尽;在甲醇诱导相中,流加甲醇(含 12 mL/L 的 PTM1),利用甲醇检测流加控制器(华东理工大学研制)在线控制发酵液中甲醇浓度为 0.10%±0.02% (V/V),维持 DO 在 10%–20%。

1.2.2 样品采集:甘油流加相中当细胞生长密度 OD₆₀₀ 达到 110 时取样;在甲醇诱导相中培养 48 h 时取样。样品处理方法为在无菌条件下收集发酵液样品,在 6000 r/min、4 °C 条件下离心 15 min,收

集菌体沉淀, 将菌体沉淀在液氮中速冻 5–10 min 后–80 °C 保存, 用于转录组 RNA 样品抽提, 同时制备 2 个平行重复样品。

1.3 转录组文库测序

1.3.1 Total RNA 样品抽提和检测: Total RNA 样品抽提依据 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 操作说明提取 Total RNA。

Total RNA 样品检测: (1) 琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 降解程度以及是否有污染; (2) Nanodrop 检测 RNA 的纯度($OD_{260/280}$); (3) Qubit 对 RNA 浓度进行精确定量; (4) Agilent 2100 精确检测 RNA 的完整性。

1.3.2 文库构建和库检: 文库构建及测序由诺禾致源生物信息科技有限公司完成。Total RNA 检测合格后, 通过 Epicentre Ribo-Zero™ 试剂盒去除 rRNA。随后将 RNA 打断成 150–200 bp 短片段, 以短片段 RNA 为模板, 用六碱基随机引物合成 cDNA, 纯化双链 cDNA。纯化的双链 cDNA 再进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头, 然后用 AMPure XP beads 进行片段大小选择。之后降解含有 U 的 cDNA 第二链, 最后进行 PCR 富集得到链特异性 cDNA 文库。文库构建完成后, 先使用 Qubit 2.0 进行初步定量, 使用 Agilent 2100 对文库进行检测, 使用 QPCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量, 以保证文库质量。

1.3.3 上机测序: 把构建的文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求进行 Illumina HiSeq 4000 测序。

1.4 生物信息分析流程

获得原始测序序列(Sequenced reads)后, 在有参考基因组(*K. phaffii* GS115)的情况下, 通过如下方法进行生物信息分析。(1) 表达水平分析: 对

mRNA 用 cuffdiff 软件进行定量分析^[6], 得到各样本 mRNA 的 FPKM (Reads per kilobase of exon model per million mapped reads) 信息; (2) 差异表达分析: 从统计学意义的角度上考虑, 使用 cuffdiff 软件对 mRNA 整体进行差异分析; (3) 差异表达 mRNA 所在基因 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 富集分析: 基于 mRNA 的差异分析获得 KEGG 富集分析的结果和差异表达 mRNA KEGG 富集通路图, 并进行 KEGG 富集表达聚类的分析。本文中所有代谢路径相关基因皆引自 KEGG 数据库。

1.5 反转录及荧光定量 PCR 方法测定 mRNA

使用逆转录酶(Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, AMV RT, 上海生工), 从总 RNA 合成第一链 cDNA 的试剂盒, 合成第一链 cDNA, 具体操作步骤见产品说明书。将 cDNA 样品适当稀释作为模板上机检测。配置荧光定量 PCR (QPCR) 体系混合液, 按照表 1 所示反应体系配制反应混合液。按照试剂盒中酶的特性设定荧光定量 PCR 循环条件, 进行荧光定量 PCR 实验。

1.6 总蛋白含量测定

利用考马斯亮蓝法测定发酵液上清中总蛋白浓度^[7]。

1.7 SDS-PAGE 分析

发酵上清液样品采用 SDS-PAGE 分析^[8], 选用浓缩胶 5%, 分离胶 12%, 检测发酵上清液蛋白分子量。

2 结果和分析

2.1 毕赤酵母分批发酵结果

毕赤酵母发酵过程分为 3 个阶段, 分别为甘

油生长相、甘油流加相及甲醇诱导相。为了研究甲醇诱导和甘油培养条件下基因表达差异,根据菌株发酵生长曲线,选取具有代表性样品取样点。在甘油生长相结束时即甲醇诱导前取样,样品命名为 P;在甲醇诱导相的对数期(48 h)时取样,样品命名为 PLM。样品信息如表 2 所示。

在毕赤酵母分批发酵过程中,甘油生长相结束

时取样(P),即图 1-A 中 0 h;甲醇诱导 48 h 取样(PLM),如图 1-A 中 48 h。表达磷脂酶 A₂ 的毕赤酵母菌体浓度 OD_{600} 及蛋白浓度变化如图 1-A 所示,相比甲醇诱导初期,诱导 48 h 后总蛋白浓度达 1.25 g/L。菌株发酵上清液 SDS-PAGE 如图 1-B 所示,括号所示为表达的磷脂酶 A₂ 蛋白,存在 3 条带,前期实验鉴定表明为不同程度糖基化形式^[3]。

表 1. 荧光定量 PCR 体系
Table 1. Real-time PCR system

Reaction system	Volume/ μ L	Final concentration
2xSG Fast qPCR Master Mix (High Rox)	10.0	1 \times
Primer F (10 μ mol/L)	0.5	200 nmol/L
Primer R (10 μ mol/L)	0.5	200 nmol/L
ddH ₂ O	7.0	6
Template (cDNA)	2.0	< 20 ng

表 2. 毕赤酵母菌株培养和样本特性
Table 2. Culture of *K. phaffii* and sample characteristics

Strains	Carbon source	Description	Sample name
GS115/pPIC9K-PLA2	Glycerol	Sampling at the end of glycerol fed-batch phase	P
GS115/pPIC9K-PLA2	Methanol	Sampling at 48 h after methanol induction	PLM

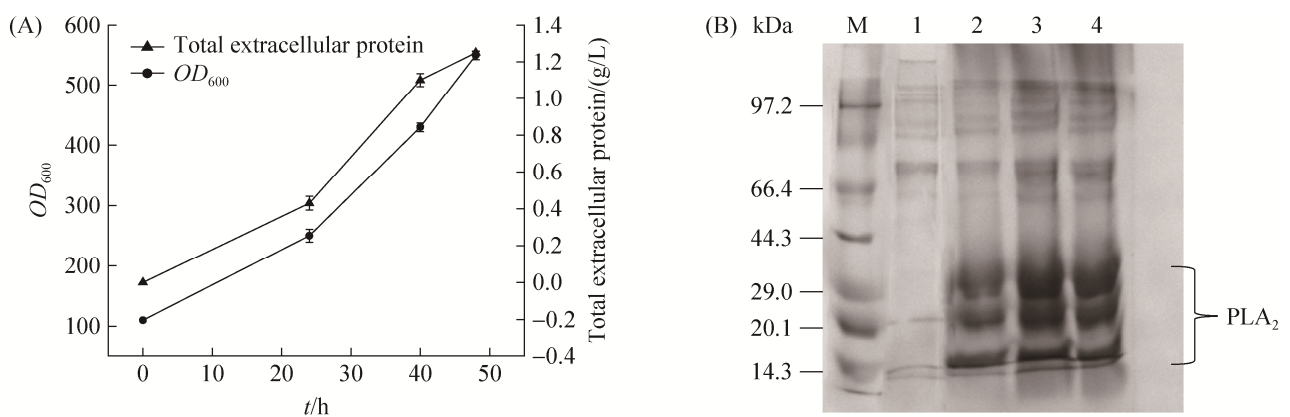


图 1. 毕赤酵母分批发酵过程生物量、胞外总蛋白浓度变化(A)和上清液总蛋白浓度 SDS-PAGE 图(B)

Figure 1. Changes in biomass, total extracellular protein concentration (A) and SDS-PAGE analysis (B) during batch fermentation in *K. phaffii*. M: molecular weight marker; lane 1: methanol induction for 0 hour; lane 2: methanol induction for 24 hours; lane 3: methanol induction for 40 hours; lane 4: methanol induction for 48 hours.

2.2 荧光定量 PCR 验证转录数据

荧光定量 PCR 原理是采用荧光信号强度达到预先设定的阈值时(C_T)的循环数作为计量的方法。荧光定量 PCR 利用 C_T 值的变化表示基因在不同表达下差异表达倍数, 而 RNA-Seq 依据基因表达量(FPKM)的比值表示。利用 Actin 作为内参, 计算甲醇诱导与甘油培养条件下基因差异变化倍数(公式 1-2)。

$$\text{Foldchange (QPCR)} = \frac{2^{(C_T \text{ Actin} - C_T \text{ Methanol})}}{2^{(C_T \text{ Actin} - C_T \text{ Glycerol})}} \quad \text{公式(1)}$$

$$\text{Foldchange (RNA - Seq)} = \frac{\text{FPKM}(\text{Methanol})}{\text{FPKM}(\text{Glycerol})} \quad \text{公式(2)}$$

利用荧光定量 PCR 验证 RNA-Seq 测定的准确

性, 引物设计如表 3。从表 4 中可以看出荧光定量 PCR 和 RNA-Seq 结果基本相一致。

2.3 毕赤酵母总体代谢途径变化分析

毕赤酵母 *K. phaffii* GS115/pPIC9K-PLA2 在甘油和甲醇两种条件下, 共鉴定到 5225 个转录本, 有 857 个基因发生显著变化。图 1 展示了每个代谢途径中显著差异基因的数目、比例和显著性, 显著变化基因分布在 89 个 KEGG 代谢途径中, 约占 76.7%。

从各 KEGG pathway 的基因数目可以看出(图 2), 发生显著变化基因主要在核糖体、核糖体生物合成、DNA 修复、过氧化物酶体、硫代谢和

表 3. 荧光定量 PCR 引物列表

Table 3. A list of quantitative PCR primers

Target	Primers (5'→3')	Target	Primers (5'→3')
HSP42F	AAGCACTCAAGGAGGAAGGC	ITR2F	CGCCAAAGTCATCGGCAAAA
HSP42R	ACTGTGATTCAGGAGCTGGC	ITR2R	TGATCCTGGGATGATGGCG
PAS_chr2-1_0854F	GGGTCAAAGAGAAACAAACGGA	RPP1BF	GCCAAAGGTTTGGAAAGCAA
PAS_chr2-1_0854R	GGGTCAAAGAGAAACAAACGGA	RPP1BR	GTTCTCCTCTTCGGCCTCCT
HSP78F	AAAATGACGGGTGTTCCGGT	RPP1AF	GCTTTATCATACGCCGCCCT
HSP78R	TGACTGCATCGGCAACTGAA	RPP1AR	TAACGTCAGCCTTGGTGGTC
HSP82F	TGGGTGTCCATGAAGACAGC	RPL10F	CCAGGTGTTCCTACTGGCATT
HSP82R	TCTGGTGCTCTGGCATTCTG	RPL10R	TAAATAGGGGAAGAAGTTCA
HSP104F	TTCCAGTGTGGTTGGGCAAT	CPR6F	GGTTAACCAGTTACCGGCCT
HSP104R	TTCCAGTGTGGTTGGGCAAT	CPR6R	TCACAGCAAACAGCCGATCT

表 4. 不同基因 RNA-Seq 和荧光定量 PCR 验证结果

Table 4. Verification of RNA-Seq data by QPCR

Gene name	Fold change (QPCR)	Fold change (RNA-Seq)
<i>HSP42</i>	9.811679	7.075784
<i>PP7435_CHR3-0854</i>	32.256100	7.247684
<i>HSP84</i>	12.393400	8.619475
<i>HSP82</i>	9.626424	9.308960
<i>HSP104</i>	9.126110	9.954715
<i>ITR2</i>	12.248220	10.769280
<i>RPP1B</i>	0.488524	0.306753
<i>RPPIA</i>	0.302289	0.233974
<i>RPL10</i>	0.063219	0.059403
<i>CPR6</i>	15.215820	15.579320

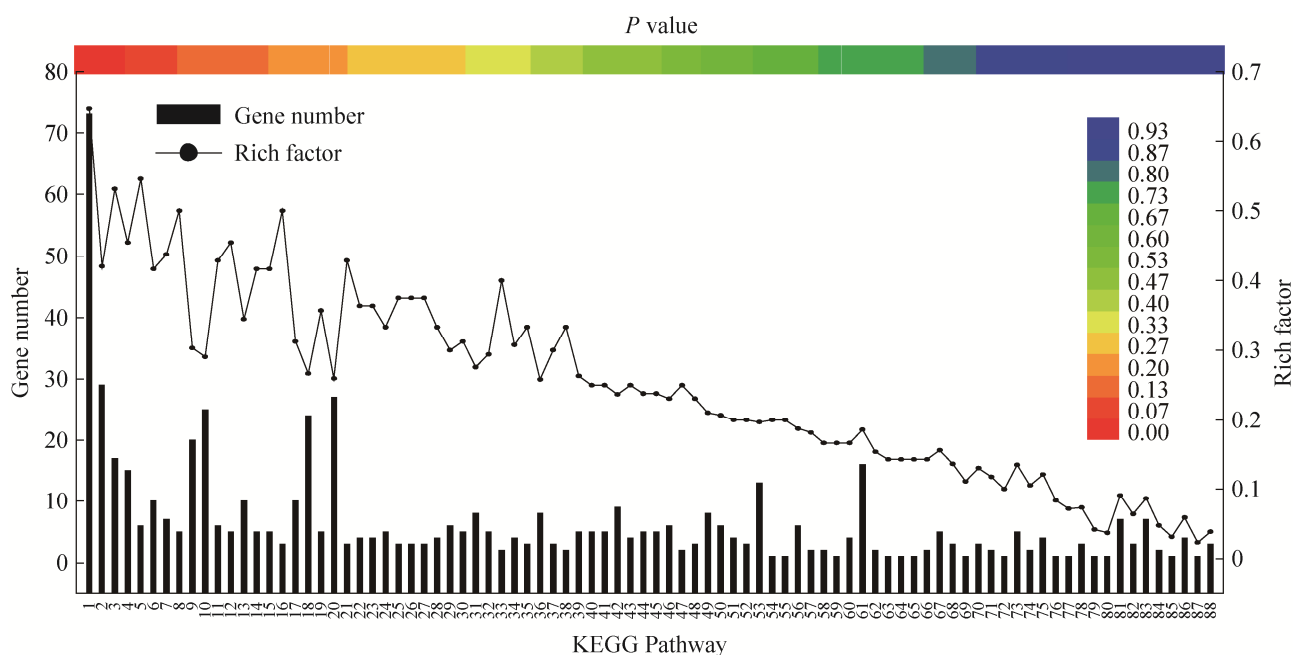


图 2. 毕赤酵母在甘油培养和甲醇诱导条件下 KEGG pathway 热图及相关 KEGG pathway 基因数目和富集因子
 Figure 2. Heat map of KEGG pathway with gene number and enrichment factor in *K. phaffii* in the comparison of glycerol and methanol conditions. Gene number: The number of genes enriched in the pathway; Rich factor: The ratio of the number of genes enriched in the pathway to the number of all the annotation genes of the pathway. 1: Ribosome; 2: Ribosome biogenesis in eukaryotes; 3: DNA replication; 4: Peroxisome; 5: Sulfur metabolism; 6: Methane metabolism; 7: Base excision repair; 8: Valine, leucine and isoleucine biosynthesis; 9: Pyrimidine metabolism; 10: Purine metabolism; 11: Pantothenate and CoA biosynthesis; 12: Riboflavin metabolism; 13: 2-Oxocarboxylic acid metabolism; 14: Tyrosine metabolism; 15: Sphingolipid metabolism; 16: Thiamine metabolism; 17: Cysteine and methionine metabolism; 18: Carbon metabolism; 19: Phenylalanine metabolism; 20: Biosynthesis of amino acids; 21: Fatty acid elongation; 22: Pentose and glucuronate interconversions; 23: Fatty acid degradation; 24: Tryptophan metabolism; 25: Butanoate metabolism; 26: Vitamin B6 metabolism; 27: Selenocompound metabolism; 28: Histidine metabolism; 29: Glutathione metabolism; 30: Glyoxylate and dicarboxylate metabolism; 31: RNA polymerase; 32: beta-Alanine metabolism; 33: Ascorbate and aldarate metabolism; 34: Valine, leucine and isoleucine degradation; 35: Galactose metabolism; 36: Arginine and proline metabolism; 37: Biosynthesis of unsaturated fatty acids; 38: ABC transporters; 39: Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis; 40: Glycerolipid metabolism; 41: Mismatch repair; 42: Glycolysis/Gluconeogenesis; 43: Porphyrin and chlorophyll metabolism; 44: Fatty acid metabolism; 45: Fructose and mannose metabolism; 46: Alanine, aspartate and glutamate metabolism; 47: Non-homologous end-joining; 48: One carbon pool by folate; 49: Nucleotide excision repair; 50: Pyruvate metabolism; 51: Homologous recombination; 52: Steroid biosynthesis; 53: Meiosis-yeast; 54: Taurine and hypotaurine metabolism; 55: Degradation of aromatic compounds; 56: Glycerophospholipid metabolism; 57: Propanoate metabolism; 58: Lysine biosynthesis; 59: Nitrogen metabolism; 60: Amino sugar and nucleotide sugar metabolism; 61: Cell cycle-yeast; 62: Inositol phosphate metabolism; 63: Cyanoamino acid metabolism; 64: Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis; 65: Fatty acid biosynthesis; 66: Lysine degradation; 67: Glycine, serine and threonine metabolism; 68: Pentose phosphate pathway; 69: Phosphatidylinositol signaling system; 70: Starch and sucrose metabolism; 71: Terpenoid backbone biosynthesis; 72: Sulfur relay system; 73: Aminoacyl-tRNA biosynthesis; 74: Protein export; 75: Phagosome; 76: Nicotinate and nicotinamide metabolism; 77: Regulation of autophagy; 78: mRNA surveillance pathway; 79: Citrate cycle (TCA cycle); 80: N-Glycan biosynthesis; 81: Oxidative phosphorylation; 82: RNA degradation; 83: RNA transport; 84: Endocytosis; 85: Basal transcription factors; 86: Protein processing in endoplasmic reticulum; 87: Ubiquitin mediated proteolysis; 88: Spliceosome.

甲醇代谢等代谢过程中。其中,核糖体和核糖体生物合成这两个代谢途径变化最为显著,核糖体中有 73 个基因发生显著变化,核糖体生物合成中有 29 个基因发生显著变化。通过 RNA-Seq 检测转录组结果表明,在甲醇诱导条件下,约 65%核糖体组分和 42%核糖体生物合成过程相关基因变化显著,说明核糖体对外源蛋白合成起到了重要作用。

文献报道利用 RNA-Seq 测序技术研究米黑根毛霉脂肪酶在毕赤酵母中甲醇诱导表达时,多聚核糖体的比例在总核糖体(40S, 60S, 80S/monosomes 和 polysomes)中提高了约 2 倍^[9-10]。甲醇提供碳源的同时,也诱导外源蛋白大量表达,此时不仅需要合成大量氨基酸,而且需要更多核糖体参与蛋白质合成^[9]。因此,通过提高胞内核糖体数量和核糖体加工过程相关基因的表達量,可以作为提高外源蛋白表达量的一种策略。

2.4 毕赤酵母中心碳代谢基因差异表达

毕赤酵母细胞碳代谢途径主要包括甲醇代谢、糖酵解、TCA 循环、磷酸戊糖途径、糖醛酸途径、糖原合成、糖原分解、糖异生以及其他己糖代谢等。尤其是甲醇代谢途径、糖酵解途径、TCA 循环和磷酸戊糖途径等代谢过程会产生大量中间代谢产物,为其他代谢过程提供底物。甘油生长期,胞内代谢途径主要集中在氧化磷酸化、糖酵解、TCA 循环以及电子呼吸链;甲醇诱导期,胞内的代谢途径主要集中在甲醇代谢途径^[11]。甘油和甲醇分别经同化吸收后,进入以 TCA 循环为中心的碳代谢过程。有研究者研究了甲醇代谢途径(MUT pathway)和其相关代谢路径^[12-14]。结合毕赤酵母代谢路径和本全转录组数据绘制了甲醇代谢以及磷酸戊糖途径代谢过程路径图(图 3),主要

包含 5 部分:细胞吸收甲醇在过氧化物酶体中经过甲醇代谢(图 3-Part 1),代谢产生的 H_2O_2 在 ROS (图 3-Part 2)途径^[13]的作用下降低氧化力生成 O_2 ,一部分甲醇氧化成甲醛经过异化过程生成 CO_2 (图 3-Part 3),另一部分甲醛进入磷酸戊糖途径,最终 1 分子甲醇生成 1/3 分子甘油三磷酸(GAP),用于生物质合成(图 3-Part 4,图 3-Part 5)。

2.4.1 毕赤酵母甘油代谢和甲醇代谢差异表达: 毕赤酵母细胞以甘油和甲醇分别作为唯一碳源时,细胞生长状态不尽相同,胞内代谢系统也相应做出部分调整。毕赤酵母以甘油作为唯一碳源培养时,主要经过甘油代谢同化外界碳源。首先,甘油在甘油激酶不可逆催化下形成磷酸甘油,再经磷酸甘油脱氢酶和磷酸丙糖异构酶(*TPII*)分别催化形成磷酸二氢丙酮和 3-磷酸甘油醛,此后,即可进入糖酵解生成丙酮酸,进而生成乙酰 CoA,进入三羧酸循环。甘油促进细胞生长,此时外源蛋白几乎不表达^[15]。在甲醇作为唯一碳源时,甲醇促进细胞生长同时诱导外源蛋白表达,甲醇氧化场所在过氧化物酶体中^[13]。从 KEGG 数据库获取甲醇代谢相关基因,毕赤酵母以甲醇为唯一碳源进行新陈代谢和甘油培养时,基因差异表达倍数如表 5 所示。

表 5 中展示了甲醇代谢途径中相关基因差异表达情况,其中 *DAS2*、*DAS1*、*SHB17*、*ACS2*、*AOX1*、*FDH1*、*FGH1*、*SER3*、*FLD* 和 *AGX1* 均显著上调。在甲醇诱导条件下,甘油代谢相关基因 *STL1* (Glycerol proton symporter of the plasma membrane)和 *GUT1* (Glycerol kinase)分别下调了 3 倍和 1 倍,这和实验结果相符合。Liang 等发现甲醇诱导毕赤酵母后,甲醇代谢相关基因转录水平也发生了显著上调^[16]。甲醇代谢途径的中间代谢产物 GAP 和二羟基丙酮(DHAP)为 TCA 循环、

磷酸戊糖途径以及糖酵解途径中生物质合成提供前体物质及能量。另外，过氧化物酶体功能基因 *PMP20*、*PEX12*、*PEX13* 和 *PEX2* 分别上调了 156.9 倍、2.8 倍、6.1 倍和 4.4 倍(表 6)。过氧化物酶体中甲醇代谢相关基因显著上调(如表 5 所示)，以及过氧化物酶体结构组分表达量也提高,促进了对碳源吸收,为生物质合成提供碳源和能量,磷脂酶被大量合成,胞外蛋白总浓度达 1.25 g/L(图 1)。

上述研究结果表明,在甲醇诱导条件下细胞做出精细的系统调控,维持细胞内环境稳定。

2.4.2 毕赤酵母内磷酸戊糖途径基因差异表达:

磷酸戊糖途径不但为微生物提供能量,还可为微生物提供大量前体物质,是重要的代谢途径。有学者研究发现甲醇诱导外源蛋白表达时,菌株细胞生物质产生降低了 25%,但是磷酸戊糖途径代谢增强了重组蛋白的表达量^[17-18]。

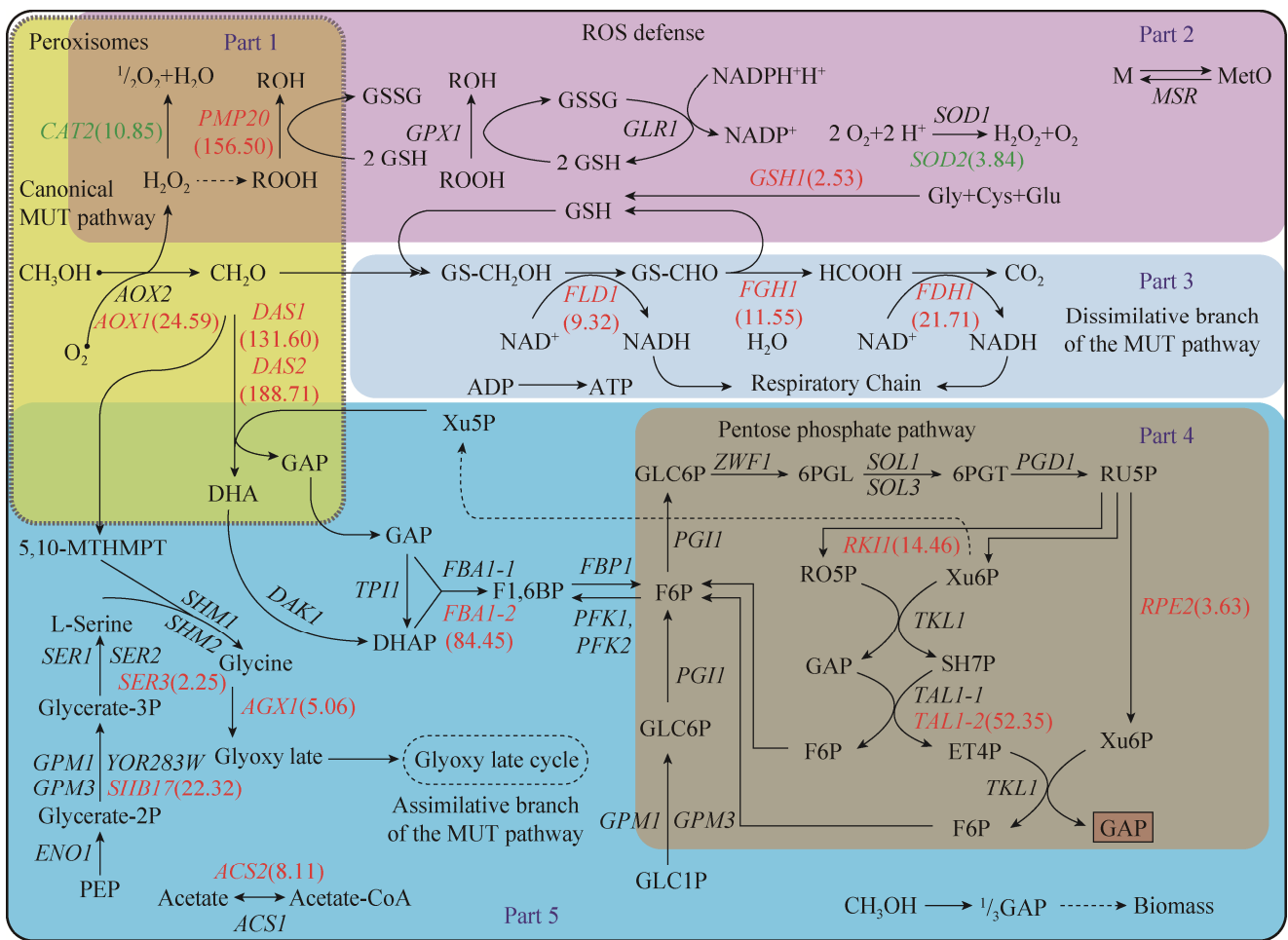


图 3. 毕赤酵母甲醇代谢以及磷酸戊糖途径代谢过程路径图及差异表达基因

Figure 3. Differentially expressed genes of MUT pathway and pentose phosphate pathway in *K. phaffii*. Part 1 : Canonical MUT pathway; Part 2: ROS defense; Part 3: Dissimilative branch of the MUT pathway; Part 4: Pentose phosphate pathway; Part 5: Assimilative branch of the MUT pathway. Red: Significant up-regulated gene; Green: Significant down-regulated gene; Black: No significant change gene. Fold change: FPKM (Methanol)/FPKM (Glycerol); *P*-value: Enrichment analysis of *P* value (<0.05).

表 5. 毕赤酵母甲醇诱导与甘油培养甲醇代谢基因差异倍数

Table 5. The foldchange of the significant differentially expressed genes involved in methanol metabolism genes in the comparison of methanol and glycerol cultivation in *K. phaffii*

Gene ID	Gene name	Description	Fold change	P value
PAS_chr3_0834	<i>DAS2</i>	Transketolase, similar to Tk12p	200.85	2.89E-15
PAS_chr3_0832	<i>DAS1</i>	Transketolase, similar to Tk12p	131.60	6.12E-12
PAS_chr4_0821	<i>AOX1</i>	Alcohol oxidase 1	24.59	0.000124
PAS_chr2-2_0177	<i>SHB17</i>	Putative protein of unknown function	22.32	2.55E-06
PAS_chr3_0932	<i>FDH1</i>	NAD-dependent formate dehydrogenase, may protect cells from exogenous formate	21.71	0.000236
PAS_chr3_0867	<i>FGH1</i>	Non-essential intracellular esterase that can function as an S-formylglutathione hydrolase	11.55	0.001231
PAS_chr3_1028	<i>FLD1</i>	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	9.32	0.007054
PAS_chr3_0403	<i>ACS2</i>	acetate-CoA ligase	8.11	2.97E-06
PAS_chr4_0416	<i>AGX1</i>	Alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT), catalyzes the synthesis of glycine from glyoxylate	5.06	0.011088
PAS_chr3_0841	<i>DAK2</i>	Dihydroxyacetone kinase, required for detoxification of dihydroxyacetone (DHA)	4.06	0.126775
PAS_chr3_0868	<i>FBP1</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase, key regulatory enzyme in the gluconeogenesis pathway	3.56	0.095237
PAS_chr2-1_0657	<i>SER3</i>	3-phosphoglycerate dehydrogenase, catalyzes the first step in serine and glycine biosynthesis	3.25	0.005038
PAS_chr4_0152	<i>AOX2</i>	Alcohol oxidase 2	2.03	0.256310
PAS_chr4_0415	<i>SHM2</i>	Cytosolic serine hydroxymethyltransferase	1.38	0.552604
PAS_chr4_0285	<i>SER2</i>	Phosphoserine phosphatase of the phosphoglycerate pathway, involved in serine and glycine biosynthesis	1.21	0.637429
PAS_chr1-1_0427	<i>YOR283W</i>	Hypothetical protein	1.19	0.661960
PAS_chr3_0566	<i>SER1</i>	3-phosphoserine aminotransferase	-1.23	0.615148
PAS_chr4_0587	<i>SHM1</i>	Mitochondrial serine hydroxymethyltransferase	-1.40	0.584437
PAS_chr1-4_0047	<i>PFK2</i>	Beta subunit of heterooctameric phosphofructokinase involved in glycolysis	-1.64	0.460753
PAS_chr2-1_0402	<i>PFK1</i>	Alpha subunit of heterooctameric phosphofructokinase involved in glycolysis	-1.74	0.415801
PAS_chr3_0693	<i>GPM3</i>	Tetrameric phosphoglycerate mutase	-2.14	0.056185
PAS_chr3_0826	<i>GPM1</i>	Tetrameric phosphoglycerate mutase	-2.45	0.143465
PAS_chr1-1_0072	<i>FBA1-1</i>	Fructose 1,6-bisphosphate aldolase, required for glycolysis and gluconeogenesis	-2.55	0.252666
PAS_chr3_0082	<i>ENO1</i>	Enolase I, a phosphopyruvate hydratase that catalyzes the conversion of 2-phosphoglycerate to phosph	-3.89	0.109996
PAS_chr2-1_0767	<i>ACS1</i>	Acetate-CoA ligase	-5.58	0.060806

Fold change: FPKM (PLM)/FPKM (P).

表 6. 毕赤酵母甲醇诱导与甘油培养过氧化物酶体显著差异基因差异倍数

Table 6. The foldchange of the significant differentially expressed genes involved in peroxisome in the comparison of methanol and glycerol cultivation in *K. phaffii*

Gene ID	Gene name	Description	Fold change	P value
PAS_chr1-4_0547	<i>PMP20</i>	Peroxiredoxin	156.94	1.14442E-12
PAS_chr3_0099	<i>PMP47</i>	Peroxisome membrane protein 47	17.60	7.84274E-05
PAS_chr2-2_0207	<i>PEX13</i>	Integral peroxisomal membrane protein required for translocation of peroxisomal matrix proteins	6.16	0.00308638
PAS_chr4_0416	<i>PAS_chr4_0416</i>	Alanine: glyoxylate aminotransferase (AGT)	5.06	0.01107180
PAS_chr3_0043	<i>PEX2</i>	RING-finger peroxin and E3 ubiquitin ligase	4.35	0.00815035
PAS_chr2-1_0230	<i>MRP1</i>	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit	3.52	0.00246982
PAS_chr4_0788	<i>RSM26</i>	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit	2.96	0.01130610
PAS_chr4_0759	<i>PEX12</i>	C3HC4-type RING-finger peroxin and E3 ubiquitin ligase	2.84	0.03105350
PAS_chr2-1_0580	<i>IDP1</i>	Cytosolic NADP-specific isocitrate dehydrogenase	-3.02	0.02428140
PAS_chr2-2_0272	<i>PXA2</i>	Subunit of a heterodimeric peroxisomal ATP-binding cassette transporter complex (Pxa1p-Pxa2p)	-3.28	0.02075670
PAS_chr1-4_0071	<i>SOD2</i>	Mitochondrial manganese superoxide dismutase	-3.85	0.02331130
PAS_chr3_0975	<i>SPS19</i>	Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase, auxiliary enzyme of fatty acid beta-oxidation	-4.87	0.00745497
PAS_chr4_0352	<i>FAA2</i>	Medium chain fatty acyl-CoA synthetase, activates imported fatty acids	-5.60	0.02847880
PAS_chr2-1_0502	<i>PAS_chr2-1_0502</i>	Thiol-specific peroxiredoxin	-7.58	0.00236159
PAS_chr3_0069	<i>CAT2</i>	Carnitine acetyl-CoA transferase present in both mitochondria and peroxisomes	-10.85	0.00112011
PAS_chr1-4_0074	<i>YATI</i>	Outer mitochondrial carnitine acetyltransferase	-18.24	0.00042053

Fold change: FPKM (PLM)/FPKM (P).

磷酸戊糖途径(图 3-Part 4)分为氧化阶段和非氧化阶段^[19]。氧化阶段是细胞产生还原力(NADPH)的主要途径,氧化阶段涉及的酶有葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(*ZWF1*)、内酯酶(*SOL3*)和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(*PDGI*),其中 *ZWF1* 是糖酵解途径的限速酶基因,催化不可逆反应。非氧化阶段是指全部磷酸戊糖途径除上述 3 个酶催化反应外,都是非氧化阶段。非氧化阶段是细胞内结构分子的重要来源,并为各种单糖相互转变提供前提条件。非氧化阶段的酶有异构酶、差向异构酶、转酮酶和转醛酶,催

化不同单糖之间的转换^[19]。从图 3 中我们看出磷酸戊糖途径氧化阶段相关基因(*ZWF1*、*SOL3* 和 *PDGI*)未发生显著变化。有研究者采用过表达磷酸戊糖途径氧化阶段基因(*ZWF1*、*ZWF1/SOL3* 和 *SOL3*)显著提高了蛋白表达量^[17-18]。因此氧化阶段有待进一步研究。

转录测序结果显示非氧化阶段发生显著变化,如核酮糖-5-磷酸差向异构酶(*RPE2*),核糖-5-磷酸酮醇异构酶(*RKII*)和转醛醇酶(*TALI-2*)分别显著上调 3.86 倍、14.46 倍和 52.52 倍(表 7)。磷

酸戊糖途径为微生物代谢提供丰富的中间产物, 因此我们认为在表达磷脂酶时, 细胞为了缓解胞内代谢压力, 仅调整非氧化阶段相关基因表达量, 非氧化阶段对生物质的合成起到重要作用, 促进蛋白表达量的提高。

2.4.3 毕赤酵母糖酵解途径和 TCA 循环基因差异表达: 微生物细胞碳代谢主要包括糖酵解途径、磷酸戊糖途径和 TCA 循环。图 4 展示了碳

代谢过程酵母细胞吸收的甲醇在甲醇代谢作用下生成 GAP, 随后进入糖酵解途径, 部分碳源经过代谢作用生成果糖-6-磷酸, 进入磷酸戊糖途径。另一部分碳源在糖酵解作用下胞内丙酮酸(Pyruate)分两个代谢路径: 一部分是进入线粒体中进行 TCA 循环, 另一部分参与乙醛酸循环。TCA 循环和乙醛酸循环均为微生物提供能量和前体物质^[20-21]。

表 7. 在甘油和甲醇两种条件下毕赤酵母磷酸戊糖途径基因差异倍数

Table 7. The foldchange of the significant differentially expressed genes involved in pentose phosphate pathway in the comparison of methanol and glycerol cultivation in *K. phaffii*

Gene ID	Gene name	Description	Fold change	P value
PAS_chr2-2_0338	<i>TALI-2</i>	Transaldolase	52.52	1.96476E-11
PAS_chr4_0213	<i>RKII</i>	Ribose-5-phosphate ketol-isomerase	14.46	8.71245E-06
PAS_chr3_0441	<i>RPE2</i>	D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase	3.86	0.0105208
PAS_chr3_0868	<i>FBP1</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase	3.55	0.0951730
PAS_chr2-1_0771	<i>PGM3</i>	Phosphoribomutase	3.18	0.0221160
PAS_chr4_0212	<i>RKII-2</i>	Ribose-5-phosphate ketol-isomerase	1.75	0.3453440
PAS_chr1-1_0006	<i>PRS1</i>	5-phospho-ribosyl-1(alpha)-pyrophosphate synthetase	1.56	0.2902980
PAS_chr1-4_0669	<i>YDR248C</i>	Putative gluconokinase	1.37	0.5827380
PAS_chr3_0062	<i>PRS3</i>	5-phospho-ribosyl-1(alpha)-pyrophosphate synthetase	1.08	0.8577890
PAS_chr2-1_0308	<i>ZWF1</i>	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)	-1.11	0.8872530
PAS_chr2-2_0174	<i>PRS5</i>	5-phospho-ribosyl-1(alpha)-pyrophosphate synthetase	-1.13	0.7540340
PAS_chr1-1_0436	<i>PRS4</i>	5-phospho-ribosyl-1(alpha)-pyrophosphate synthetaseheteromultimeric complexes	-1.19	0.6699240
PAS_chr3_0604	<i>RBK1</i>	Putative ribokinase	-1.22	0.6286320
PAS_chr3_1126	<i>SOL3</i>	6-phosphogluconolactonase	-1.30	0.5544950
PAS_chr1-1_0277	<i>SOL1</i>	Protein with a possible role in tRNA export	-1.31	0.5186960
PAS_chr1-4_0047	<i>PFK2</i>	Beta subunit of heterooctameric phosphofructokinase	-1.64	0.4606660
PAS_chr2-1_0402	<i>PFK1</i>	Alpha subunit of heterooctameric phosphofructokinase	-1.74	0.4157120
PAS_chr3_0277	<i>PDG1</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating)	-1.96	0.4571960
PAS_chr1-4_0264	<i>PGM2</i>	Phosphoglucomutase	-2.42	0.2047380
PAS_chr1-1_0072	<i>FBA1-1</i>	Fructose 1,6-bisphosphate aldolase	-2.54	0.2525790
PAS_chr2-2_0337	<i>TALI-1</i>	Transaldolase	-2.69	0.1738280
PAS_chr3_0456	<i>PGII</i>	Glycolytic enzyme phosphoglucose isomerase	-2.94	0.1027780
PAS_chr1-4_0150	<i>TKL1</i>	Transketolase	-3.40	0.0888672

Fold change: FPKM (PLM)/FPKM (P).

甘油培养和甲醇诱导两种条件相较，糖酵解途径第一阶段基因如 *TPI1*、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (*TDH1*)、果糖-2,6-二磷酸酶(*FBP1*)和 *PFK1* 表达量均无明显变化(图 4)，且表达量较低，与文献报道一致^[22]。说明毕赤酵母在甘油和甲醇培养两种条件下，糖酵解第一阶段基因处于本底表达状态。过氧化物酶体中甲醇代谢产物为 GAP 和 DHAP，经过氧化物酶体膜转运至胞质进入糖酵解途径第二阶段(图 4)。果糖 1, 6-二磷酸醛缩酶(*FBA1-2*)可逆催化果糖 1, 6-二磷酸(FDP)转化为 GAP 和

DHAP。甲醇代谢途径产生的 GAP 促使 *FBA1-2* 表达量增加，形成大量代谢产物(FDP)进入磷酸戊糖途径(图 4)。测序结果显示 *FBA1-2* 基因上调 84.45 倍。上述结果证明甲醇代谢产物 GAP 部分进入磷酸戊糖途径，并为微生物提供还原力和前体物质。

在糖酵解过程磷酸甘油酸激酶(*PGK1*)催化 GAP 为磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)中，结果显示 *PGK1* 下调约 5.17 倍(图 4)，导致糖酵解能力下降。此外甲醇诱导阶段糖异生途径中磷酸烯醇丙酮酸羧化

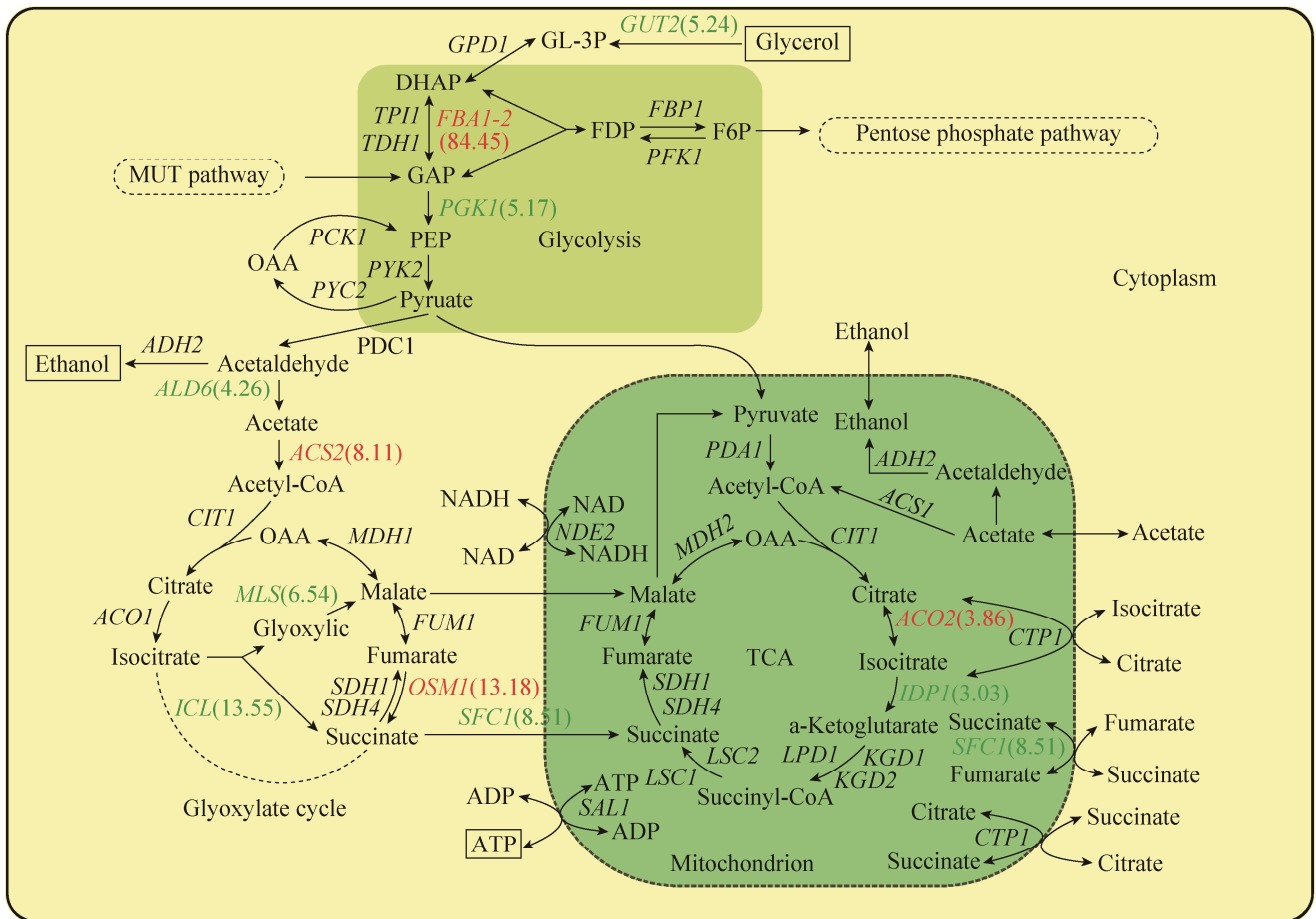


图 4. 毕赤酵母 TCA 循环和乙醛酸循环代谢图及差异表达基因

Figure 4. Differentially expressed genes of citric acid cycle and glyoxylate in *K. phaffii*. Red: Significant up-regulated gene; Green: Significant down-regulated gene; Black: No significant change gene. Fold change: FPKM (PLM)/FPKM (P); *P* value: Enrichment analysis of *P* value (<0.05).

激酶(*PCK1*)表达量较低,糖异生途径形成较少 GAP,而胞内 GAP 的主要来源是甲醇代谢途径^[10]。*TPII* 催化 GAP 和 DHAP 之间可逆转换^[18],提供还原力^[23],但在本次实验中表达水平较低。综上所述结果表明细胞内甲醇代谢形成大量 GAP 转化为 FDP,主要通过糖酵解途径第一阶段,进入磷酸戊糖途径,继续进行下一步代谢。

Almeida 等^[24]认为毕赤酵母基因组中 *PGK1* 以单拷贝形式存在,通过 Northern blot 分析不同碳源对 *PGK1* 表达影响时,葡萄糖培养条件下 *PGK1* 表达水平是甘油的 2 倍,说明在不同碳源中 *PGK1* 基因的启动子活力不同。在甲醇生长条件下,*PGK1* 基因表达显著降低,这成为了糖酵解能力下降的主要原因。

TCA 循环作为糖酵解下游代谢途径,本次实验中 TCA 循环关键基因(如苹果酸合酶基因、琥珀酰-CoA 基因)并未发生明显变化,仅线粒体中催化柠檬酸形成异柠檬酸的乌头酸酶基因(*ACO2*)显著上调 3.86 倍。在甘油培养和甲醇诱导两种条件下,毕赤酵母线粒体中异柠檬酸脱氢酶基因(*IDP1*)下调 3.03 倍。

有研究者^[25]比较酵母葡萄糖和甲醇作为碳源培养时的生长状况,得出甲醇生长条件下 TCA 循环代谢流降低 3 倍,同时 TCA 循环中没有转录水平或者蛋白水平发生显著改变,仅柠檬酸产量增加。此外,依据酵母代谢组和转录组的结果分析,假丝酵母甲醇培养条件下 TCA 循环中物质和基因表达量普遍下降^[26]。

上述结果表明在甲醇诱导条件下,胞内 TCA 循环过程的电子链氧化磷酸化供能需求降低,TCA 循环代谢流降低,TCA 循环为其他代谢途径提供前体物质能力减弱。

2.4.4 毕赤酵母乙醛酸循环基因差异表达:乙醛

酸循环中有异柠檬酸裂合酶(*ICL1*)和苹果酸合酶(*MLS*)两个关键酶,催化异柠檬酸和乙酰辅酶 A 转化成苹果酸和琥珀酸(图 4)。在甲醇诱导条件下,*ICL* 和 *MLS* 表达量分别比甘油培养条件下降低了约 13.55 倍和 6.54 倍。乙醛酸循环中间代谢产物富马酸(Succinate)由线粒体琥珀酸富马酸转运子(*SFC1*, Mitochondrial succinate-fumarate transporter)转运至线粒体 TCA 循环中,结果表明在甲醇诱导表达外源蛋白时 *SFC1* 下调 8.51 倍,这与文献报道^[27]一致。*SFC1* 下调导致乙醛酸循环进入 TCA 循环的代谢流进一步降低。以上研究结果表明,以甲醇作为碳源,乙醛酸代谢途径和 TCA 循环部分受到抑制,而甲醇代谢途径及磷酸戊糖途径得到增强,重新建立代谢平衡。

研究发现毕赤酵母表达外源蛋白时 *ICL1* 基因表达量下调^[27]。但是,也有研究报道提高酿酒酵母中乙醛酸循环相关基因(如 *ADH2*、*MLS*、*CIT2* 和 *ICL1* 等)的表达有利于提高糖基化外源蛋白表达量^[28]。在本研究中甲醇诱导外源蛋白表达过程中发现 *ICL* 和 *MLS* 表达量显著下调,其机制还有待进一步验证。

2.4.5 毕赤酵母外源蛋白质在内质网加工过程中的差异表达:蛋白质分选、折叠和二硫键形成是蛋白表达的限速步骤^[29]。外源蛋白合成过程中,内质网参与蛋白质折叠、分选以及降解等相关功能。成熟 mRNA 在核糖体中翻译成多肽,信号识别颗粒(SRP)牵引多肽一端至内质网膜上,SRP 受体与 SRP 结合,在结合蛋白(*KAR2*)的参与下,多肽由细胞质转移到内质网腔内进行加工和修饰。

Kar2p 是热激蛋白 70 家族重要的伴侣蛋白,促使蛋白正确折叠,参与蛋白质易位、ER 相关的降解(ERAD)、以及未折叠蛋白的调控^[30]。另外 *KAR2* 激活 Ire1 形成二聚体,调节 *HAC1* 合成,降

低内质网压力,促进蛋白质合成^[31]。伴侣蛋白基因 *KAR2* 作为胞内 UPR 效应^[29]的标志,在内质网中积聚错误折叠蛋白,引发保护机制 UPR 效应^[32-33]。甲醇诱导条件下,毕赤酵母内质网中 *KAR2* 表达量提高 5.90 倍(图 5)。上述测序结果表明,在甲醇诱导条件下, *KAR2* 表达量上升,进入内质网中的多肽增多,促使蛋白大量表达,磷脂酶表达过程中产生未正确折叠的状态,引发了毕赤酵母内质网中 UPR 效应。因此,提高 UPR 效应相关基因

表达量有利于提高外源蛋白表达量。

胞内蛋白质未正确折叠,稳定性降低,不仅会激活 UPR 效应,还会引发内质网相关联的蛋白降解途径(ERAD)。有研究者发现 ERAD 效应可通过标签基因(*HRD3*、*DER1* 和 *SEC61*)^[34]或者解聚酶基因(*HSP104*)和 AAA ATP 酶基因(*CDC48*)^[35]表达量检测得到。本实验中 *HRD3*、*DER1* 和 *SEC61* 分别非显著上调 1.1 倍、1.2 倍和 1.9 倍,同时 *HSP104* 和 *CDC48* 未有明显变化。说明本研究过

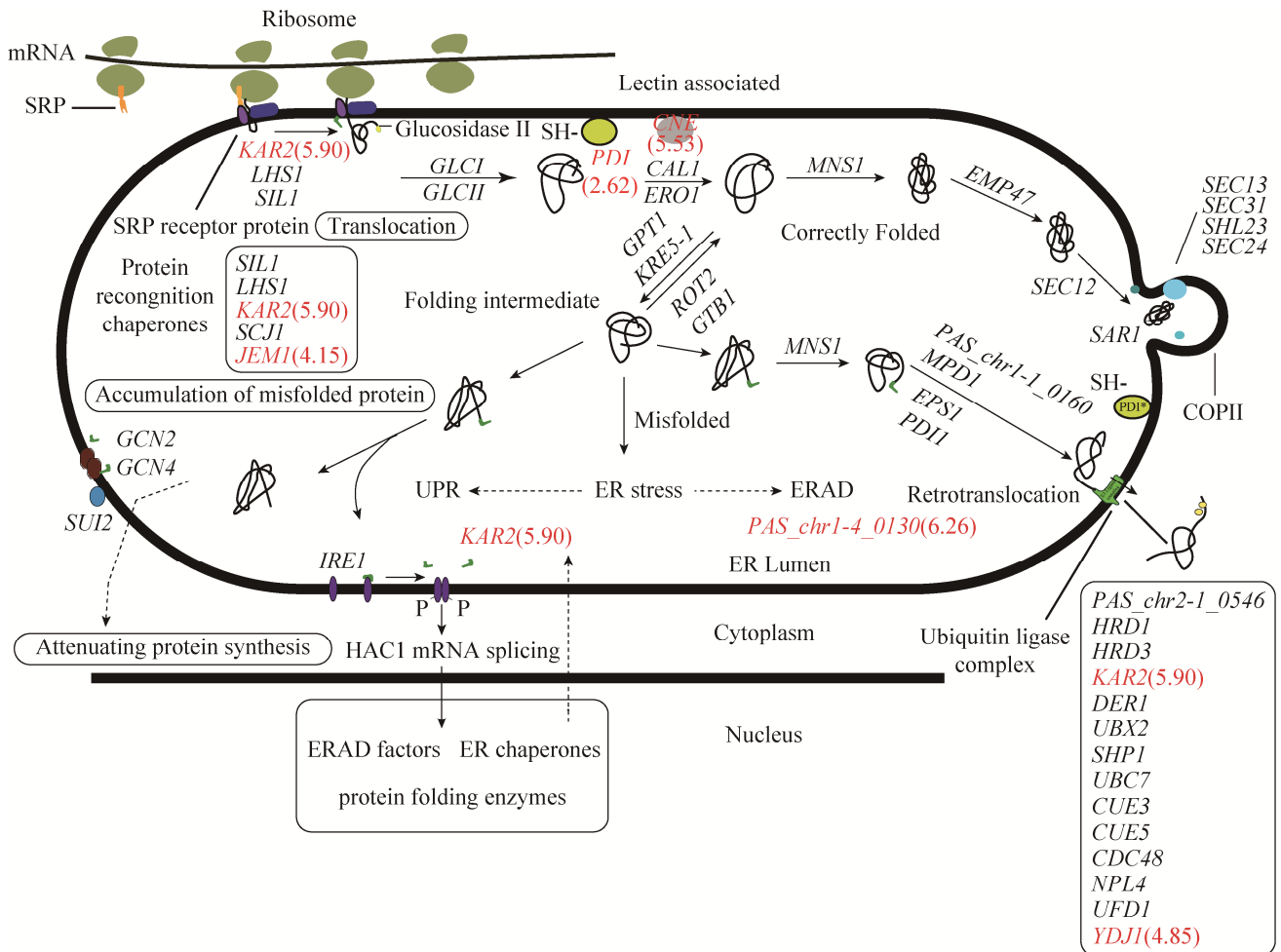


图 5. 毕赤酵母中外源蛋白质在内质网中加工过程示意图及差异表达基因

Figure 5. Differentially expressed genes involved in protein processing in endoplasmic reticulum in *K. phaffii*. Red: Significant up-regulated gene; Green: Significant down-regulated gene; Black: No significant change gene. Fold change: FPKM (PLM)/FPKM (P); P value: Enrichment analysis of P value (<0.05).

程中, 磷脂酶基因在毕赤酵母中表达未引起 ERAD 效应, 表明毕赤酵母中磷脂酶的表达量依然有上升的空间。

蛋白质二硫键异构酶(*PDII*)催化膜表面蛋白和分泌蛋白形成二硫键, 二硫键的形成是蛋白质合成主要的限速步骤^[36]。本研究中, 外源蛋白磷脂酶中存在 3 对二硫键。相对于甘油培养条件, 在甲醇诱导条件下 *PDII* 转录水平提高了 2.62 倍。研究者发现毕赤酵母中共表达 *PDII* 可增强外源蛋白分泌作用, 蛋白表达量显著提高^[30,37-39]。在微生物代谢过程中, 蛋白折叠和内质网压力影响胞内的氧化平衡, *PDII* 可维持胞内氧化还原的平衡^[40]。因此, 在毕赤酵母中可通过共表达 *PDII* 调节细胞内的氧化还原平衡, 很可能进一步提高磷脂酶 A₂ 的表达量。

3 讨论

利用第二代测序技术可加深对微生物认识深度, 为探究微生物代谢机制寻求突破。本实验室前期利用毕赤酵母表达磷脂酶 A₂ 已经取得较好表达效果^[3], 本文进一步探讨毕赤酵母在甲醇诱导条件下高效表达外源蛋白的机制。当环境条件变化时, 微生物胞内的代谢会做适当调整。毕赤酵母由甘油培养转变为甲醇诱导时, 代谢差异基因主要集中在核糖体、核糖体生物合成、DNA 修复、过氧化物酶体、硫代谢和甲醇代谢等途径。尤其是核糖体含量提高, 增强核糖体和核糖体生物合成途径, 能够提高蛋白加工速度和加工准确性, 从而提高蛋白表达量。

毕赤酵母以甲醇为唯一碳源进行新陈代谢时, 甲醇代谢相关基因显著上调, 甲醇代谢途径中间代谢产物(GAP 和 DHAP)为 TCA 循环、磷酸

戊糖途径以及糖酵解途径中生物物质合成提供前体物质及能量, 提高了外源蛋白的表达量。但研究发现毕赤酵母在磷酸戊糖途径氧化阶段相关基因(*ZWF1*、*SOL3* 和 *PGDI*)无明显变化, 非氧化阶段的 *TAL1-2*、*RPE2* 分别发生了显著上调 14.46 倍和 52.52 倍, 我们推测细胞为了缓解胞内的代谢压力, 仅调整非氧化阶段相关基因的表达量, 非氧化阶段在表达磷脂酶基因过程中对提高外源蛋白表达起到了重要作用。另一方面, 细胞质中乙醛酸循环的关键酶基因(*ICL* 和 *MLS*)表达水平显著下调, 说明乙醛酸循环流量降低。位于线粒体 TCA 循环中的 *IDPI* 下调约 3 倍, 胞内 TCA 循环过程的电子链氧化磷酸化供能需求降低, TCA 循环代谢流降低。综上所述, 甲醇诱导和甘油培养相较, 胞内碳代谢表现为甲醇代谢上调, 磷酸戊糖途径部分上调, 乙醛酸循环下调以及 TCA 循环下调。说明碳代谢中心(TCA 循环)供能的作用减弱, 代谢主要集中在甲醇代谢和磷酸戊糖途径。

内质网参与蛋白加工过程, 是研究蛋白质合成的重要场所, 也是微生物定向改造的重要目标之一。内质网蛋白识别因子如 *KAR2*、*LHS1*、*SCJ1* 和 *JEMI* 在甲醇诱导时上调, 对于蛋白识别、牵引蛋白进入内质网有重要作用。研究报道表明, 为了促进内质网中外源蛋白的折叠与加工, 共表达内质网中伴侣蛋白及 UPR 相关基因, 如 *KAR2* 和 *PDII*, 以促进蛋白质正确折叠和修饰^[30]。微生物细胞内质网合成大量未正确折叠外源蛋白, 在内质网中积累, 引发 ERAD 效应^[30]。本实验中检测得到 ERAD 效应标签基因表达量较低, 说明磷脂酶基因在毕赤酵母中表达过程中未引起 ERAD 效应。因此, 毕赤酵母中磷脂酶表达量依然有上升的空间。

参考文献

- [1] Kurtzman CP. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009, 36(11): 1435–1438.
- [2] 梁书利. 基于 RNA-Seq 技术的毕赤酵母转录组学研究及其表达元件的挖掘. 华南理工大学博士学位论文, 2012.
- [3] Liu AX, Yu XW, Sha C, Xu Y. *Streptomyces violaceoruber* Phospholipase A2: expression in *Pichia pastoris*, properties, and application in oil degumming. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 175(6): 3195–3206.
- [4] Chu YJ, Corey DR. RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation. *Nucleic Acid Therapeutics*, 2012, 22(4): 271–274.
- [5] Zhang CL, Qin ZJ, Wang GZ, Ji ZB, Wang JM. Transcriptome and RNA-Seq technology. *Biotechnology Bulletin*, 2012, (12): 51–56. (in Chinese)
张春兰, 秦孜娟, 王桂芝, 纪志宾, 王建民. 转录组与 RNA-Seq 技术. *生物技术通报*, 2012, (12): 51–56.
- [6] Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 2012, 7(3): 562–578.
- [7] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [8] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227(5259): 680–685.
- [9] Beilharz TH, Preiss T. Translational profiling: the genome-wide measure of the nascent proteome. *Briefings Functional Genomics & Proteomics*, 2004, 3(2): 103–111.
- [10] Prielhofer R, Cartwright SP, Graf AB, Valli M, Bill RM, Mattanovich D, Gasser B. *Pichia pastoris* regulates its gene-specific response to different carbon sources at the transcriptional, rather than the translational, level. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 167.
- [11] Ren HT, Yuan JQ, Bellgardt KH. Macrokinetic model for methylophilic *Pichia pastoris* based on stoichiometric balance. *Journal of Biotechnology*, 2003, 106(1): 53–68.
- [12] Vogl T, Sturmberger L, Kickenweiz T, Wasmayer R, Schmid C, Hatzl AM, Gerstmann MA, Pitzer J, Wagner M, Thallinger GG, Geier M, Glieder A. A toolbox of diverse promoters related to methanol utilization: functionally verified parts for heterologous pathway expression in *Pichia pastoris*. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(2): 172–186.
- [13] van der Klei IJ, Yurimoto H, Sakai Y, Veenhuis M. The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylophilic yeast. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2006, 1763(12): 1453–1462.
- [14] Vanz AL, Lünsdorf H, Adnan AM, Gurrakonda C, Khanna N, Rinas U. Physiological response of *Pichia pastoris* GS115 to methanol-induced high level production of the Hepatitis B surface antigen: catabolic adaptation, stress responses, and autophagic processes. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 103.
- [15] Orman MA, Çalık P, Özdamar TH. The influence of carbon sources on recombinant-human-growth-hormone production by *Pichia pastoris* is dependent on phenotype: a comparison of *Mut^s* and *Mut⁺* strains. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2009, 52(3): 245–255.
- [16] Liang SL, Wang B, Pan L, Ye YR, He MH, Han SY, Zheng SP, Wang XN, Lin Y. Comprehensive structural annotation of *Pichia pastoris* transcriptome and the response to various carbon sources using deep paired-end RNA sequencing. *BMC Genomics*, 2012, 13: 738.
- [17] Nocon J, Steiger M, Mairinger T, Hohlweg J, Rußmayer H, Hann S, Gasser B, Mattanovich D. Increasing pentose phosphate pathway flux enhances recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(13): 5955–5963.
- [18] Nocon J, Steiger MG, Pfeffer M, Sohn SB, Kim TY, Maurer M, Rußmayer H, Pflügl S, Ask M, Haberhauer-Troyer C, Ortmayr K, Hann S, Koellensperger G, Gasser B, Lee SY, Mattanovich D. Model based engineering of *Pichia pastoris* central metabolism enhances recombinant protein production. *Metabolic Engineering*, 2014, 24: 129–138.
- [19] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学. 下册. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [20] Jouhten P, Rintala E, Huuskonen A, Tamminen A, Toivari M, Wiebe M, Ruohonen L, Penttilä M, Maaheimo H. Oxygen dependence of metabolic fluxes and energy generation of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-1A. *BMC Systems Biology*, 2008, 2: 60.
- [21] Solà A, Jouhten P, Maaheimo H, Sánchez-Ferrando F, Szyperski T, Ferrer P. Metabolic flux profiling of *Pichia pastoris* grown on glycerol/methanol mixtures in chemostat cultures at low and high dilution rates. *Microbiology*, 2007, 153(Pt 1): 281–290.
- [22] Yuan W, Tuttle DL, Shi YJ, Ralph GS, Dunn WA.

- Glucose-induced microautophagy in *Pichia pastoris* requires the alpha-subunit of phosphofructokinase. *Journal of Cell Science*, 1997, 110(Pt 16): 1935–1945.
- [23] Krüger A, Grüning NM, Wamelink MMC, Kerick M, Kirpy A, Parkhomchuk D, Bluemlein K, Schweiger MR, Soldatov A, Lehrach H, Jakobs C, Ralser M. The pentose phosphate pathway is a metabolic redox sensor and regulates transcription during the antioxidant response. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011, 15(2): 311–324.
- [24] de Almeida JR, de Moraes LM, Torres FA. Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast*, 2005, 22(9): 725–737.
- [25] Rußmayer H, Buchetics M, Gruber C, Valli M, Grillitsch K, Modarres G, Guerrasio R, Klavins K, Neubauer S, Drexler H, Steiger M, Troyer C, Al Chalabi A, Krebiehl G, Sonntag D, Zellnig G, Daum G, Graf AB, Altmann F, Koellensperger G, Hann S, Sauer M, Mattanovich D, Gasser B. Systems-level organization of yeast methylotrophic lifestyle. *BMC Biology*, 2015, 13: 80.
- [26] Tamakawa H, Tomita Y, Yokoyama A, Konoeda Y, Ikushima S, Yoshida S. Metabolomic and transcriptomic analysis for rate-limiting metabolic steps in xylose utilization by recombinant *Candida utilis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2013, 77(7): 1441–1448.
- [27] Dragosits M, Stadlmann J, Graf A, Gasser B, Maurer M, Sauer M, Kreil DP, Altmann F, Mattanovich D. The response to unfolded protein is involved in osmotolerance of *Pichia pastoris*. *BMC Genomics*, 2010, 11: 207.
- [28] Abe H, Fujita Y, Chiba Y, Jigami Y, Nakayama KI. Upregulation of genes involved in gluconeogenesis and the glyoxylate cycle suppressed the drug sensitivity of an *N*-glycan-deficient *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2009, 73(6): 1398–1403.
- [29] Hohenblum H, Gasser B, Maurer M, Borth N, Mattanovich D. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 85(4): 367–375.
- [30] Guan B, Chen FX, Su S, Duan ZY, Chen Y, Li HZ, Jin J. Effects of co-overexpression of secretion helper factors on the secretion of a HSA fusion protein (IL2-HSA) in *Pichia pastoris*. *Yeast*, 2016, 33(11): 587–600.
- [31] Damasceno LM, Huang CJ, Batt CA. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(1): 31–39.
- [32] Guerfal M, Ryckaert S, Jacobs PP, Ameloot P, Van Craenenbroeck K, Derycke R, Callewaert N. The *HAC1* gene from *Pichia pastoris*: characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9: 49.
- [33] Hesketh AR, Castrillo JI, Sawyer T, Archer DB, Oliver SG. Investigating the physiological response of *Pichia (Komagataella) pastoris* GS115 to the heterologous expression of misfolded proteins using chemostat cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(22): 9747–9762.
- [34] Whyteside G, Alcocer MJ, Kumita JR, Dobson CM, Lazarou M, Pleass RJ, Archer DB. Native-state stability determines the extent of degradation relative to secretion of protein variants from *Pichia pastoris*. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22692.
- [35] Vanz AL, Lünsdorf H, Adnan A, Nimtze M, Gurrnkonda C, Khanna N, Rinas U. Physiological response of *Pichia pastoris* GS115 to methanol-induced high level production of the Hepatitis B surface antigen: catabolic adaptation, stress responses, and autophagic processes. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 103.
- [36] Gasser B, Maurer M, Gach J, Kunert R, Mattanovich D. Engineering of *Pichia pastoris* for improved production of antibody fragments. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 94(2): 353–361.
- [37] Gasser B, Sauer M, Maurer M, Stadlmann G, Mattanovich D. Transcriptomics-based identification of novel factors enhancing heterologous protein secretion in yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(20): 6499–6507.
- [38] Gasser B, Maurer M, Rautio J, Sauer M, Bhattacharyya A, Saloheimo M, Penttilä M, Mattanovich D. Monitoring of transcriptional regulation in *Pichia pastoris* under protein production conditions. *BMC Genomics*, 2007, 8: 179.
- [39] Ben Azoun S, Belhaj A E, Göngrich R, Gasser B, Kallel H. Molecular optimization of rabies virus glycoprotein expression in *Pichia pastoris*. *Microbial Biotechnology*, 2016, 9(3): 355–368.
- [40] Delic M, Rebnegger C, Wanka F, Puxbaum V, Haberhauer-Troyer C, Hann S, Köllensperger G, Mattanovich D, Gasser B. Oxidative protein folding and unfolded protein response elicit differing redox regulation in endoplasmic reticulum and cytosol of yeast. *Free Radical Biology and Medicine*, 2012, 52(9): 2000–2012.

Transcriptome analysis of recombinant *Komagataella phaffii* with methanol induced expression of phospholipase A₂

Yingzheng Wang, Xiaowei Yu*, Yan Xu*

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objectives] In order to study the mechanism of heterologous protein expression in *Komagataella phaffii*, transcriptomics technology was used to study the profile of differentially expressed genes in the recombinant *K. phaffii* during the methanol-induced expression of phospholipase A₂. **[Methods]** We used RNA sequencing (RNA-seq) technology to analyze the differentially expressed genes in the recombinant *K. phaffii* expressing phospholipase A₂ between glycerol and methanol cultivation condition. **[Results]** In total 5225 transcripts were identified in the recombinant *K. phaffii*. Compared between glycerol and methanol cultivation condition, 857 genes were significant differentially expressed. According to KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) analysis, the differentially expressed genes were mostly related to ribosome composition, methanol metabolism, pentose phosphate pathway, citric acid cycle, glyoxylic acid cycle and protein processing process. **[Conclusions]** A global effect on the metabolism was observed when changing the carbon source from glycerol to methanol for the induction of heterologous protein. Our results provide rich information for further in-depth studies of the mechanism of protein expression in *K. phaffii*.

Keywords: *Komagataella phaffii*, transcriptome, methanol induce, glycerol culture, metabolic mechanism

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31671799) and by the Six Talent Peaks Project in Jiangsu Province (NY-010)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918201; E-mail: bioyuxw@aliyun.com

Received: 18 January 2017; Revised: 30 March 2017; Published online: 5 April 2017