

改良毕赤酵母分泌表达外源蛋白能力的研究进展

关波¹, 金坚^{1,2}, 李华钟^{1*}

江南大学,¹ 工业生物技术教育部重点实验室,² 医药学院, 无锡 214122

摘要:巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 由于能高效表达正确折叠加工的外源蛋白而成为目前最具应用前景的表达宿主。但随着对大量不同外源蛋白在毕赤酵母中分泌表达的研究发现,并不是所有蛋白均能高效分泌表达,这严重限制了毕赤酵母这一表达系统的推广应用。相关研究发现,外源蛋白在内质网中的聚集是限制酵母分泌表达外源蛋白的主要因素,因此近年来开始尝试通过基因操作改良毕赤酵母表达外源蛋白的能力。本文综述了这一领域的研究进展。

关键词: 巴斯德毕赤酵母, 外源蛋白, 分泌表达, 折叠加工, 未折叠蛋白响应

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2011) 07-0851-07

毕赤酵母作为目前广泛用于表达外源蛋白尤其是人源蛋白的重要宿主,拥有诸多优点:相比哺乳动物细胞,毕赤酵母的培养方式更简便,线性化的外源 DNA 通过同源重组的方式可以高效整合到酵母基因组中获得稳定遗传的菌株,并且通过高密度培养可以大幅提高蛋白表达量;毕赤酵母本身是真核生物,表达蛋白能够经过正确折叠和翻译后修饰而具有生物活性^[1];此外,毕赤酵母可以甲醇为单一碳源,在 AOX 启动子的严密调控下高效分泌表达外源蛋白^[2]。截止到 2005 年,已有超过 500 个基因在毕赤酵母中得到成功表达^[1]。

然而随着大量不同外源蛋白在毕赤酵母中的表达,发现毕赤酵母对不同外源蛋白的表达量差异较大^[3]。在过去 10 年,酵母等真核表达系统中药物蛋白的产量通过高密度培养增长了近百倍,但在细胞水平蛋白表达量并没有得到显著提高^[4]。因此,迫切需要通过基因操作手段在细胞水平提升毕赤酵母这一广泛使用的真核表达系统的蛋白表达量。

已有的研究主要关注于外源蛋白的分泌表达与基因拷贝数^[4],信使 RNA 含量^[5]等因素之间的关系。然而最近的研究发现,外源蛋白的分泌表达量低往往是其在内质网中的聚集造成的^[6]。通过采用不同启动子或增加基因拷贝数的策略来增强毕赤酵母表达外源蛋白,相当含量的外源蛋白仍然滞留在胞内而未被分泌表达^[7]。大量研究结果表明^[8-10],初生多肽链在内质网中的折叠、加工以及囊泡运输等过程常常是影响外源蛋白分泌表达的限速步骤。但目前对外源蛋白在分泌途径中加工修饰的分子机制的了解还十分有限。国内外针对蛋白折叠加工相关过程进行遗传改良的研究处于初步探索阶段,仅见 Schröder 等^[4]对真核细胞加工折叠外源蛋白分子机制的综述。结合本实验室药物蛋白表达过程中的相关初步研究,本文对基因工程增强巴斯德毕赤酵母表达外源蛋白能力的最新研究进展进行简要综述。

基金项目:国家自然科学基金(30970029)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-510-85913536; E-mail: hzhli@jiangnan.edu.cn

作者简介:关波(1984-)男,新疆人,博士研究生,研究方向为生物制药。E-mail: GBB3519@yahoo.com.cn

收稿日期:2010-12-29;修回日期:2011-03-07

1 主要的内质网驻留蛋白及其折叠加工外源蛋白的分子机制

内质网腔是将分泌表达蛋白折叠成天然构

象,并对不正确折叠构象蛋白进行严格筛选的主要场所^[11]。内质网驻留蛋白包括3类:折叠酶、分子伴侣和凝集素伴侣。几种主要的内质网驻留蛋白对多肽/蛋白质的折叠加工分子机制如图1所示。

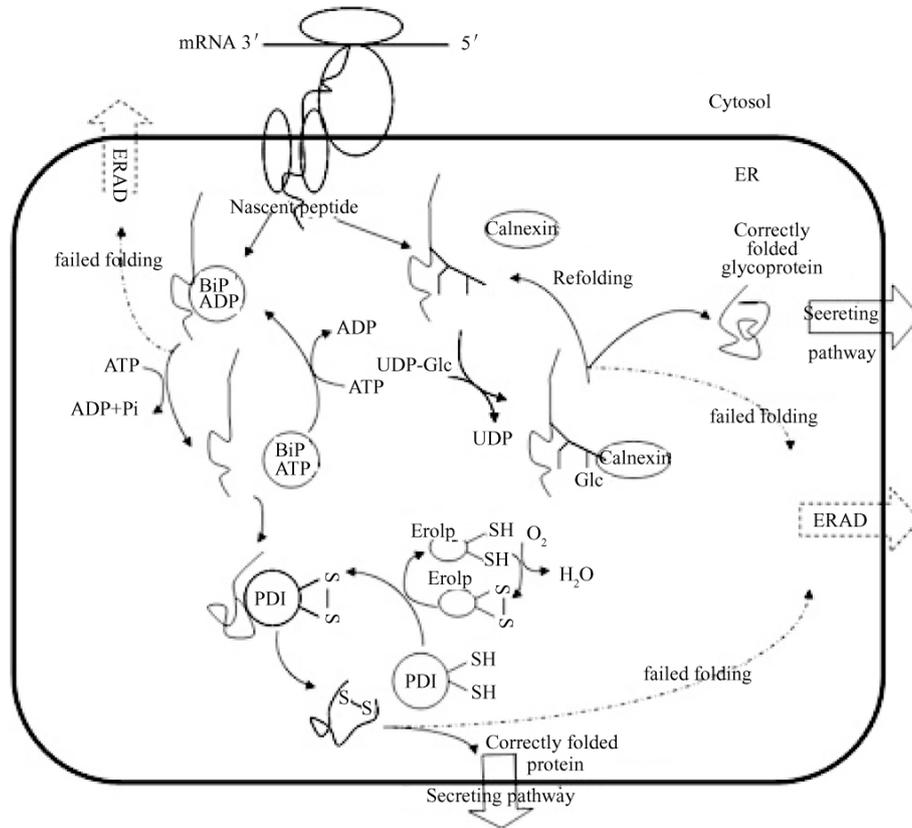


图1 酵母内质网中主要驻留蛋白折叠加工外源蛋白分子机制的示意图

Fig.1 Schematic representation of protein folding, quality control, degradation and secretion in yeast. Chaperone BiP could bind with nascent peptide, and facilitate the folding progress by consuming ATP; Foldase PDI further accelerates the protein folding process by formation of correct disulfide bonds mediated in a cycle of Pdi and Ero1; Nascent glycoproteins are bound by calnexin and mediated to correct folding and processing of the N-glycans. Correctly folded and processed proteins are released to transport vesicles, while failed folding leads to binding by the BiP complex and targeting to ERAD.

驻留于内质网的分子伴侣 BiP 会与初生多肽链结合,通过屏蔽未折叠区域与邻近蛋白的相互作用来辅助蛋白质折叠。属于 HSP70 分子伴侣家族中的 BiP 主要作用于初生多肽链并促进其向内质网的转运^[12]。具有活性的 BiP 需要通过水解 ATP 再生,因而蛋白的折叠是一个消耗 ATP 的过程^[13]。另外,BiP 和另一种 HSP70 分子伴侣 Lhs1p 会协同促进各自的活性。Lhs1p 是 BiP 的一个核苷交换因子,BiP 则会激活 Lhs1p 的 ATPase 活性^[14]。HSP90 分子伴侣也需要消耗 ATP 发挥作用并受到多种辅分子伴侣的调控。这些辅分子伴侣可以将底物装载到 HSP90 分子伴侣上,辅助蛋白的折叠以及将底物

靶向到降解途径中^[4]。

折叠酶类中的二硫键异构酶(PDI)主要负责催化加速对蛋白质的进一步折叠。PDI 具有二硫键依赖和非依赖的分子伴侣活性^[15],负责二硫键的形成和异构化。二硫键的形成需要氧化型 PDI 的再生,这一过程主要由黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)依赖的氧化酶 Ero1p^[16]或 Erv2p^[17-18]催化,最终的电子受体是分子氧^[16,18]。二硫键的异构化则不依赖 Ero1p 氧化酶,还原性的谷胱甘肽可以提供还原力打开错误形成的二硫键^[4]。

凝集素伴侣(Calnexin)则主要参与了糖蛋白的折叠和初步的糖基化修饰过程,只有正确折叠和装

配的糖蛋白会被转运到高尔基体进行进一步的糖基化修饰,最终转运到细胞外或其他细胞器。而错误折叠或聚集的蛋白则通过内质网的一套检测系统被识别,重新转运到胞质或蛋白酶体中进入内质网相关的降解途径(ERAD)^[19],以避免其对蛋白折叠系统造成毒害。

2 内质网驻留蛋白的遗传改良

由于内质网具有对蛋白质进行折叠加工以及严格筛选的复杂机制,该过程常常成为分泌表达外源蛋白的限速环节。目前,共表达分子伴侣和 PDI 等基因是对内质网驻留蛋白进行遗传改良的主要策略。

共表达酿酒酵母的 BiP 基因(*Kar2*)可以促进毕赤酵母分泌表达外源蛋白^[20]。但共表达 BiP 对改良宿主分泌表达外源蛋白的能力常常存在较大差异。BiP 的共表达甚至对外源蛋白表达造成负面影响,比如,共表达 BiP 反而降低了葡萄糖氧化酶的表达量^[21]。过表达 BiP 可能导致其辅分子伴侣 Lhs1p 或内质网腔内的 ATP 含量等成为限制因素,而过多的 BiP 已不能发挥分子伴侣活性,从而使蛋白进入 ERAD 途径而被降解。BiP 参与内质网功能的多个方面,并与多种其他分子伴侣间存在相互作用。因而共表达 BiP 的同时再共表达辅分子伴侣能够更有效的提高外源蛋白的分泌表达^[22]。共表达酿酒酵母 BiP 和 PDI 基因的结果表明,同时共表达 BiP 与 PDI 的细胞分泌 scFV 的量最高。并且 BiP 和 PDI 似乎与新合成的 scFV 在折叠过程的不同阶段相互作用,推测 BiP 主要辅助未折叠或部分折叠 scFV 的转运和保持折叠状态,而 PDI 通过它的二硫键催化或异构化活性促进 scFV 的折叠^[23]。

共表达 PDI 可能对富含半胱氨酸外源蛋白的分泌表达有显著促进作用。Inan 等^[8]在表达富含半胱氨酸的美洲板口线虫(*Necator americanus*)分泌性蛋白(Na-ASPI)时发现,共表达 PDI 可以有效提高多拷贝菌株分泌表达该蛋白能力。共表达 PDI 不仅显著提高了富含半胱氨酸的分泌性人白细胞蛋白抑制剂(SLPI)的表达量,并且表达产物形成了正确的三级结构而具有更高的活性^[24]。共表达酿酒酵母的 PDI 基因(*ScPDI*)也可显著促进不含半胱氨酸残基的外源蛋白的分泌表达,这表明 PDI 也可能通过

其分子伴侣活性促进外源蛋白的分泌表达^[25]。

内质网中的多种驻留蛋白都对蛋白质的正确折叠有不同程度的贡献。有研究分析了组合共表达不同内质网驻留蛋白对毕赤酵母分泌表达外源蛋白的影响^[26]。结果显示,共表达单个分子伴侣使外源蛋白的分泌表达量增加 4-7 倍,但组合共表达不同分子伴侣则进一步提高了外源蛋白的分泌表达量,表明不同分子伴侣可能存在协同促进作用。

3 未折叠蛋白响应(UPR)及其信号转导途径的操纵

表达分泌性外源蛋白常常使细胞内积累大量未正确折叠的蛋白,大量未折叠蛋白在内质网的滞留会对内质网造成胁迫。作为一种自我防御机制,受到未折叠蛋白胁迫的细胞会产生未折叠蛋白响应(UPR)。

目前发现酵母中 UPR 的信号途径主要是 IRE1 调控的 *HAC1* 途径^[27],其信号转导的分子机制如图 2 所示。单次跨膜的丝氨酸/苏氨酸激酶 IRE1 (inositol-requiring enzyme 1)具有位于内质网腔的二聚化结构域,以及位于胞质中的蛋白激酶活性和内切核酸酶活性结构域^[28]。当内质网中积累大量未及时折叠的蛋白时,大量 BiP (*Kar2*)与驻留在内质网膜上的 IRE1 解离,IRE1 感知这种胁迫信号并由单体结合为二聚体。二聚化的 IRE1 通过其激酶结构域的一种罕见的自磷酸化作用,激活其内切核酸酶结构域针对特异性底物(*HAC1* mRNA)的内切核酸酶活性^[28]。IRE1 对 *HAC1* mRNA 进行两次切割将其中的内含子序列切除,剪接获得的 mRNA 编码 UPR 靶基因的转录激活因子(*Hac1p*)。翻译获得的 *Hac1p* 通过与 UPR 靶向基因的 UPR 顺式作用元件(UPRE)结合激活下游靶基因的转录。

UPR 调控的下游靶基因除了包括内质网驻留的各种分子伴侣(BiP /*KAR2*, *LHS1*, *FKB2*)和折叠酶(*PDI1*, *EUG1*, *ERO1*)基因、ERAD 相关基因,还包括参与肌醇合成途径以及膜的生物合成相关基因、蛋白质糖基化作用相关基因^[29],因而未折叠蛋白响应有着广泛的调控作用。目前认为 UPR 调控的下游基因会产生 3 种生理效应^[28]: 1 短期适应:通过减少蛋白质的合成以及向内质网的转运,减少进入内质网腔的未折叠蛋白量。2 长期适应:通过激活

内质网内参与蛋白折叠加工等酶类的基因转录,增强内质网处理未折叠蛋白的能力。3 细胞凋亡:如

果前两种适应性调整仍不能重建蛋白折叠系统的平衡,最终导致细胞的凋亡。

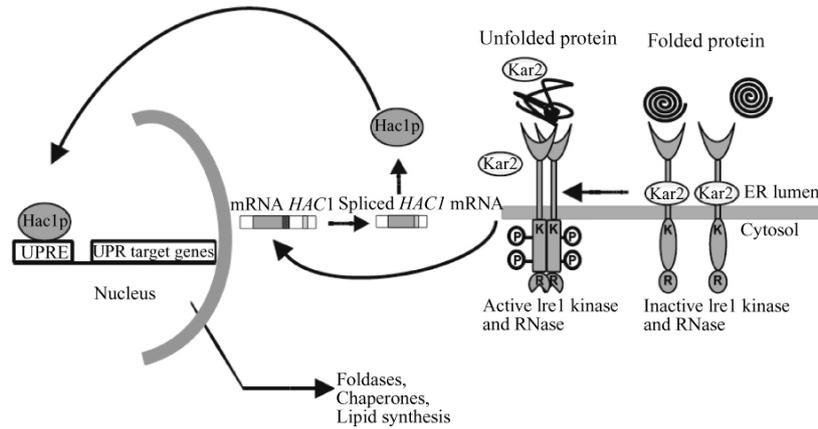


图 2 酵母中未折叠蛋白响应 (UPR) 信号通路示意图^[27]

Fig. 2 The unfolded protein response in the yeast. Upon ER stress, BiP (Kar2) dissociates from Ire1p which causes dimerization of Ire1p in the ER membrane. Dimerization causes transautophosphorylation of the kinase domain (K) and simultaneous activation of the endoribonuclease (R) activity. Activation of Ire1p initiates an unconventional mRNA splicing reaction. Hac1p could be translated from the spliced *HAC1* mRNA, and bind with UPRE and activate target genes coding for chaperones, foldases, lipid synthesis etc.

如何通过激活 UPR 来增强细胞分泌表达外源蛋白能力是近年的研究热点。通过共表达 *HAC1* 对 UPR 信号途径进行操纵,有可能提高内质网处理未折叠蛋白的能力,增强细胞分泌表达外源蛋白的能力。过表达 *HAC1* 基因可以使酿酒酵母中内源转化酵素的表达量显著增加^[30]。过表达剪接形式的成熟 *HAC1* (*HAC1ⁱ*) 可诱导多种分子伴侣的表达,使 rHSA、GM-CSF 和铁传递蛋白 (rTf) 在酿酒酵母中的分泌表达量都得到不同程度的提高^[22]。毕赤酵母中共表达酿酒酵母的 *HAC1* 基因也可以使某些外源蛋白的表达分泌量得到一定程度的增加^[31]。然而,由于 UPR 调控的效应基因涉及蛋白质折叠分泌的多个环节,需要对 UPR 靶向基因的调控网络进行更深入的解析,从而更有针对性地操纵 UPR 信号通路,增强内质网折叠加工外源蛋白的能力。

Guerfal 等^[27] 最近克隆了毕赤酵母的 *HAC1* 基因并分析其剪接位点发现,毕赤酵母中 UPR 可能被组成性的激活。通过组成型启动子 (P_{CAP}) 和诱导型启动子 (P_{AOX}) 过表达毕赤酵母 *HAC1* 基因对增强外源蛋白的分泌表达效果也有差异,诱导表达 *HAC1* 基因的菌株分泌表达外源蛋白 mIL-10 的效果更好^[27]。这些结果表明,毕赤酵母和酿酒酵母在表达外源蛋白过程中应对未折叠蛋白胁迫的机制存在一定的差异。过表达 *HAC1* 基因能否显著提高毕赤酵

母分泌表达外源蛋白的能力,有待于分析更多外源蛋白的分泌表达来确认。采用何种启动子共表达 *HAC1* 基因更有利于提高外源蛋白的表达量也值得进一步研究。

4 结合高通量实验技术和生物信息学手段增强外源蛋白的分泌表达

目前通过基因工程提升外源蛋白表达量的关键在于找到分泌途径相关的主要限速环节的靶基因。通过共表达分子伴侣以及操纵 UPR 信号途径增强不同外源蛋白的表达,结果常常有较大差异^[30, 32]。在基因组或转录组等组学水平,从更大尺度范围进行高通量的筛选,为获得能普遍增强外源蛋白表达的靶基因提供了可能。

Gasser 等^[33] 采用亲和捕获辅助的转录分析 (transcript analysis with aid of affinity capture, TRAC) 技术对 UPR 响应的靶基因进行筛选发现,除了 BiP 和 PDI 已知的 UPR 靶基因以外,ERO1、凝集素伴侣 Calnexin 以及 SEC31 等基因表达也显著上调,暗示这些基因在增强外源蛋白表达过程中的潜在作用。通过 DNA 芯片技术对毕赤酵母表达外源蛋白时所有差异表达基因进行筛选,最终获得了 6 个能够不同程度 (1.2 - 2.5 倍) 促进抗体 Fab 片段分泌表达

的新基因^[9]。这些基因除了编码分子伴侣,还包括参与蛋白转运、液泡膜 ATPase 亚基以及胞吐作用相关蛋白激酶的编码基因。通过进一步的共表达分析,有望明确这些基因是否对外源蛋白分泌表达的促进作用。

随着毕赤酵母基因组序列的公布^[34],相继有研究者构建了表达不同外源蛋白的毕赤酵母基因组尺度的代谢模型^[35-36]。利用这些代谢模型,结合计算机模拟技术,可以系统性的筛选鉴定外源蛋白表达过程中的限速环节^[36]。计算机模拟技术将会提升我们在细胞状况发生改变(基因修饰、表达外源蛋白或环境变化)时,从代谢系统的大背景来综合考虑和预测酵母细胞生理活动的的能力。因而,通过整合计算机模拟技术和各种高通量实验获得的数据(基因组学、转录组学以及代谢组学等)将有助于从整个系统水平确认外源蛋白表达过程中的限速环节。最近 Stadlmayr 等^[37]开发了一种结合荧光激活的细胞分选(fluorescence activated cell sorting, FACS)技术和 DNA 芯片技术发展而来的基因组水平的文库分选分析技术(Genome-Scale Analysis of Library Sorting, GALibSo),试图筛选到能够促进外源蛋白表达的基因。实验表明,在毕赤酵母中共表达这类基因可以不同程度地促进外源蛋白(Fab, Fab2F5 及胰蛋白酶原)的分泌表达。

5 展望

毕赤酵母兼具大肠杆菌等原核表达系统的“高效”和真核表达系统的“优质”两个优势,是表达各种药用蛋白较理想的平台。本研究小组已将人血清白蛋白(HSA)基因分别与多种药物蛋白(IFN α 2b, IFN β 和 GLP-1)基因融合并尝试在毕赤酵母中分泌表达。研究中发现,采用相同的载体和宿主表达系统,在各自优化的细胞培养和表达条件下,各种融合药物多肽/蛋白的分泌表达量都表现出相当的差异。即使是同一种药物多肽,当其和 HSA 的连接方式发生改变(即将其接入 HSA 的 N 端或 C 端),其表达量也表现出明显的差异。因此,我们认为并非毕赤酵母对不同外源蛋白有“歧视”,而是不同外源蛋白分子结构的复杂程度有差异,造成宿主在分泌表达其天然构象的活性分子过程中难易程度有差异。如何从细胞水平改善毕赤酵母分泌表达外源蛋白的能

力将是未来研究的重要方向。而外源蛋白的成功表达涉及基因转录、翻译、蛋白折叠加工、囊泡运输等分泌表达过程的多个环节,是一个精细调控的复杂系统。在对蛋白分泌表达的分子机制进行深入研究的同时,更应从整个系统水平综合考虑各种限制因素,通过基因工程对蛋白的分泌表达途径进行系统性的优化。后基因组时代快速发展的各种组学分析手段,也许会对改良毕赤酵母表达系统带来全新的机遇。

参考文献

- [1] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 2005, 22(4): 249-270.
- [2] Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular biotechnology*, 2000, 16(1): 23-52.
- [3] Porro D, Sauer M, Branduardi P, Mattanovich D. Recombinant protein production in yeasts. *Molecular biotechnology*, 2005, 31(3): 245-259.
- [4] Schroder M. Engineering eukaryotic protein factories. *Biotechnology letters*, 2008, 30(2): 187-196.
- [5] Schröder M, Friedl P. Overexpression of recombinant human antithrombin III in Chinese hamster ovary cells results in malformation and decreased secretion of recombinant protein. *Biotechnology and Bioengineering*, 1997, 53(6): 547-559.
- [6] Hohenblum H, Borth N, Mattanovich D. Assessing viability and cell-associated product of recombinant protein producing *Pichia pastoris* with flow cytometry. *Journal of biotechnology*, 2003, 102(3): 281-290.
- [7] 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.
- [8] Inan M, Aryasomayajula D, Sinha J, Meagher MM. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 93(4): 771-778.
- [9] Gasser B, Sauer M, Maurer M, Stadlmayr G, Mattanovich D. Transcriptomics-based identification of novel factors enhancing heterologous protein secretion in

- yeasts. *Applied and environmental microbiology*, 2007, 73(20): 6499-6507.
- [10] Xu P, Robinson AS. Decreased secretion and unfolded protein response up-regulation are correlated with intracellular retention for single-chain antibody variants produced in yeast. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 104(1): 20-29.
- [11] Anelli T, Sitia R. Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO journal*, 2008, 27(2): 315-327.
- [12] Schroder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutation research*, 2005, 569(1-2): 29-63.
- [13] Dorner AJ, Kaufman RJ. Analysis of synthesis, processing, and secretion of proteins expressed in mammalian cells. *Methods in enzymology*, 1990, 185: 577-596.
- [14] Steel GJ, Fullerton DM, Tyson JR, Stirling CJ. Coordinated activation of Hsp70 chaperones. *Science*, 2004, 303(5654): 98-101.
- [15] Tsai B, Rodighiero C, Lencer WI, Rapoport TA. Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell*, 2001, 104(6): 937-948.
- [16] Tu BP, Weissman JS. The FAD- and O(2)-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular cell*, 2002, 10(5): 983-994.
- [17] Gerber J, Muhlenhoff U, Hofhaus G, Lill R, Lisowsky T. Yeast ERV2p is the first microsomal FAD-linked sulfhydryl oxidase of the Erv1p/Alrp protein family. *Journal of biological chemistry*, 2001, 276(26): 23486-23491.
- [18] Sevier CS, Cuzzo JW, Vala A, Aslund F, Kaiser CA. A flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulfide bond formation. *Nature cell biology*, 2001, 3(10): 874-882.
- [19] Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS Journal*, 2007, 274(3): 630-658.
- [20] Damasceno LM, Anderson KA, Ritter G, Cregg JM, Old LJ, Batt CA. Coexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Applied microbiology and biotechnology*, 2007, 74(2): 381-389.
- [21] van der Heide M, Hollenberg CP, van der Klei IJ, Veenhuis M. Overproduction of BiP negatively affects the secretion of *Aspergillus niger* glucose oxidase by the yeast *Hansenula polymorpha*. *Applied microbiology and biotechnology*, 2002, 58(4): 487-494.
- [22] Payne T, Finnis C, Evans LR, Mead DJ, Avery SV, Archer DB, Sleep D. Modulation of chaperone gene expression in mutagenized *Saccharomyces cerevisiae* strains developed for recombinant human albumin production results in increased production of multiple heterologous proteins. *Applied and environmental microbiology*, 2008, 74(24): 7759-7766.
- [23] Xu P, Raden D, Doyle FJ, Robinson AS. Analysis of unfolded protein response during single-chain antibody expression in *Saccharomyces cerevisiae* reveals different roles for BiP and PDI in folding. *Metabolic engineering*, 2005, 7(4): 269-279.
- [24] Li Z, Moy A, Gomez SR, Franz AH, Lin-Cereghino J, Lin-Cereghino GP. An improved method for enhanced production and biological activity of human secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in *Pichia pastoris*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2010, 402(3): 519-524.
- [25] Vad R, Nafstad E, Dahl LA, Gabrielsen OS. Engineering of a *Pichia pastoris* expression system for secretion of high amounts of intact human parathyroid hormone. *Journal of biotechnology*, 2005, 116(3): 251-260.
- [26] Zhang W, Zhao HL, Xue C, Xiong XH, Yao XQ, Li XY, Chen HP, Liu ZM. Enhanced secretion of heterologous proteins in *Pichia pastoris* following overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* chaperone proteins. *Biotechnology progress*, 2006, 22(4): 1090-1095.
- [27] 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: 49-61.
- [28] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews molecular cell biology*, 2007, 8(7): 519-529.
- [29] Ng DT, Spear ED, Walter P. The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control. *Journal of cell biology*, 2000, 150(1): 77-88.
- [30] Valkonen M, Penttila M, Saloheimo M. Effects of inactivation and constitutive expression of the unfolded-protein response pathway on protein production in the

- yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 2003, 69(4): 2065-2072.
- [31] 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.
- [32] Wentz AE, Shusta EV. A novel high-throughput screen reveals yeast genes that increase secretion of heterologous proteins. *Applied and environmental microbiology*, 2007, 73(4): 1189-1198.
- [33] Gasser B, Maurer M, Rautio J, Sauer M, Bhattacharyya A, Saloheimo M, Penttila M, Mattanovich D. Monitoring of transcriptional regulation in *Pichia pastoris* under protein production conditions. *BMC Genomics*, 2007, 8: 179-197.
- [34] De Schutter K, Lin YC, Tiels P, Van Hecke A, Glinka S, Weber-Lehmann J, Rouze P, Van de Peer Y, Callewaert N. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature biotechnology*, 2009, 27(6): 561-566.
- [35] Chung BK, Selvarasu S, Andrea C, Ryu J, Lee H, Ahn J, Lee DY. Genome-scale metabolic reconstruction and in silico analysis of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for strain improvement. *Microbial cell factories*, 2010, 9: 50-65.
- [36] Sohn SB, Graf AB, Kim TY, Gasser B, Maurer M, Ferrer P, Mattanovich D, Lee SY. Genome-scale metabolic model of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its use for in silico analysis of heterologous protein production. *Biotechnology Journal*, 2010, 5: 705-715.
- [37] Stadlmayr G, Benakovitsch K, Gasser B, Mattanovich D, Sauer M. Genome-scale analysis of library sorting (GALibSo): Isolation of secretion enhancing factors for recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 105(3): 543-555.

Genetic engineering of *Pichia pastoris* expression system for improved secretion of heterologous proteins – A review

Bo Guan¹, Jian Jin^{1,2}, Huazhong Li^{1*}

¹ Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology; ² School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: Due to the potential for producing soluble, correctly folded protein with high yield, *Pichia pastoris* is currently one of the most effective hosts for the expression of heterologous proteins. However, limitations of expression efficiency are often reported for many different heterologous proteins. Accumulating evidences suggest that protein folding and processing of heterologous protein is a major bottleneck during secretion process in yeast. Apart from optimization of the fermentation process, the current strategies for strain engineering for improving protein secretion are focused mainly on folding and processing, and systematic engineering by high-throughput screening for potential secretion enhancers. This article reviews the genetic engineering progresses of these aspects.

Keywords: *Pichia pastoris*, heterologous protein, secretion, folding and processing, unfolded protein response

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30970029)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85913536; E-mail: hzhli@jiangnan.edu.cn

Received: 29 December 2010/ Revised: 7 March 2011