

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(5): 509–516; 4 May 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.05.005

重构酿酒酵母 *N*-糖基化途径生产人源化糖蛋白

贺铁凡^{1,2}, 徐沙^{1,2}, 张阁元¹, 中西秀树^{1,2}, 高晓冬^{1,2*}

江南大学,¹ 生物工程学院糖生物学与生物技术教育部重点实验室,² 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

摘要:【目的】为了在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中生产人源化的糖蛋白,必须对 *N*-糖基化途径进行基因工程改造。作者通过敲除一些酵母 *N*-糖基化途径中的特异性糖基转移酶,得到一株可以用于继续表达人类糖基转移酶的重组菌,并通过生长适应性进化技术回复其细胞生长能力。【方法】首先运用酵母遗传学和分子生物学技术敲除酿酒酵母的 α -1,3-甘露糖基转移酶基因(*ALG3*)、 α -1,6-甘露糖基转移酶基因(*OCH1*)和 α -1,3-甘露糖基转移酶基因(*MNN1*)。采用蔗糖酶(invertase)活性染色实验初步检测 *N*-糖链的变化,然后通过高效液相色谱和甘露糖苷酶酶切实验对其糖链结构进行鉴定。重组菌通过在高温条件下进行生长适应性进化,筛选出生长能力回复突变的菌株。【结果与结论】构建了 $\Delta alg3\Delta och1\Delta mnn1$ 菌株得到人类糖基化中间体 $Man_5GlcNAc_2$,并对上述三缺陷型菌株进行适应性进化提高其细胞生长能力和环境适应能力。此外,作者还发现,该重组菌存在少量 $Man_6GlcNAc_2$ 结构的糖链。经体外 α -1,2-甘露糖苷酶切处理后,糖链 $Man_5GlcNAc_2$ 和 $Man_6GlcNAc_2$ 均转化为 $Man_3GlcNAc_2$,表明形成 $Man_3GlcNAc_2$ 之后的甘露糖之间均通过 α -1,2-糖苷键连接。 $\Delta alg3\Delta och1\Delta mnn1$ 菌株的构建获得了生产人源化糖蛋白的酿酒酵母表达系统,为进一步糖基化改造和工业应用提供了良好的基础。

关键词: 人源化, *N*-糖基化, 适应性进化, 酿酒酵母

中图分类号: Q935 文章编号: 0001-6209(2014)05-0509-08

N-糖基化是一种重要的蛋白质翻译后修饰^[1],具有重要的生物学意义。糖链对糖蛋白生化性质具有重要的作用,影响到蛋白的溶解性、稳定性、血清半衰期以及免疫原性^[2-3]。糖基化修饰使蛋白质分子的性质和功能呈现出更为丰富的多样性。现在市场上已经批准使用的生物医药蛋白中有 70% 以上都是糖蛋白^[4],包括促红细胞生成素、各种干扰素、血液凝结因子、癌症诊断标记物,以及多种单克隆抗

体等^[5]。当前被用于医药糖蛋白的表达体系主要是哺乳动物细胞表达系统,但是通过哺乳动物细胞来生产糖蛋白不仅成本昂贵而且产量也很低,因此极大的限制了生物医药糖蛋白的大规模生产。研究人员已经开始寻求在细菌^[6]和酵母^[7]等微生物中表达这些糖蛋白。然而,由于细菌的糖链结构与人体相比存在较大差异,缺乏人源化糖蛋白所必需的糖基化过程,限制了其应用范围。近年来,甲醇营养

基金项目: 教育部科学技术研究重大项目; 江南大学自主科研计划项目基金(JUSRP211A25); 工业生物技术教育部重点实验室开放课题(KLIB-KF201106)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-510-85197003; E-mail: xdgao@jiangnan.edu.cn

作者简介: 贺铁凡(1987-),男,湖北钟祥人,硕士研究生,主要从事糖生物学和分子生物学的研究。E-mail: hetiefan@163.com

收稿日期: 2013-09-06; 修回日期: 2013-12-09

型酵母包括汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*),毕赤酵母(*Pichia pastoris*)等表达人源蛋白或肽类活性物以及其它中间体取得了新的进展。与毕赤酵母等体系相比,酿酒酵母表达系统虽然存在不适合高密度培养、缺乏强有力的严格调控的启动子,分泌效率较低等缺点。但作为早期广泛使用的真核表达宿主,其基因组DNA已全部测序,大部分与糖基化过程相关的基因已确定,且真核生物在内质网中的糖基化过程具有高度的保守性,极大地简化了酿酒酵母人源化过程中的基因工程操作;而且酿酒酵母不以甲醇作为唯一碳源诱导外源蛋白的表达,对于食品、医药领域来说,更为安全可靠。以毕赤酵母作为宿主表达人源化糖蛋白的研究虽然开始较早,但至今仍未有实现人源化糖蛋白的工业化生产;酿酒酵母作为模式真核微生物,如能实现阐明酿酒酵母糖蛋白人源化相关基因的表达和调控的基础上,实现利用酿酒酵母大量生产人源化糖蛋白,具有极大的理论和应用价值。然而酿酒酵母在随后的高尔基体糖基化途径中会产生人体细胞不存在的高甘露糖基化修饰,由此导致糖蛋白的免疫原性增强、半衰期缩短、活性降低等一系列不良影响,因此必须对其进行人源化改造。

酿酒酵母和哺乳动物的蛋白N-糖基化都起始于内质网。在内质网上一系列糖基转移酶的作用下形成结构为 $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-Dol-pp}$ 的脂多糖。其中 $\alpha\text{-1,3-甘露糖基转移酶 } ALG3$,催化甘露糖基转移到脂多糖 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-Dol-pp}$ 上。糖蛋白进入到高尔基体后,酿酒酵母中的糖链首先在 $\alpha\text{-1,6-甘露糖基转移酶 } OCH1$ 的作用下接受一个 $\alpha\text{-1,6-甘露糖}$,然后在一系列甘露糖转移酶的作用下连续加上若干甘露糖产生过度糖基化^[8]。*MNN1*是另外一种存在于高尔基体的 $\alpha\text{-1,3-甘露糖基转移酶}$ 基因,具有使外部糖链和核心糖链得到延伸的能力^[9-10]。为了人源化改造酿酒酵母糖基化途径,解决上述过程中的过度糖基化问题,本研究利用同源重组的方法敲除*ALG3*、*OCH1*和*MNN1*并且测定其N-糖链的结构变化,最终得到糖链结构为 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 的人源化酿酒酵母表达系统。但是糖基化缺陷型菌株细胞生长能力和环境适应能力的缺陷,导致进一步基因工程改造和工业应用都受到一定的限制。适应性进化技术的成功运用,解决了上述问题,为其大规模

工业化生产奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:酿酒酵母出发菌株W303a,质粒pFA6a-kanMX6^[11]、质粒pFA6a-his3MX^[11]、质粒pRS305Ti-Inv-FLAG、质粒pRS306由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:PCR试剂盒以及限制性内切酶购置于大连宝生物公司;PCR引物以及PCR产物回收试剂盒购置于上海生物工程公司;蛋白质凝胶配制试剂盒购置于碧云天公司;其他试剂均为进口分装或国产分析纯;PCR仪器购置于日本TaKaRa公司;蛋白质凝胶电泳仪购置于美国伯乐公司。

1.1.3 培养基和溶液配方:①YPAD培养基:每升含Tryptone 20 g, Yeast extract 10 g, Glucose 20 g, Adenine 30 mg; ②YPASuc培养基:每升含Tryptone 20 g, Yeast extract 10 g, Sucrose 20 g, Adenine 30 mg; ③YNB选择培养基:每升含Yeast nitrogen base 6.7 g, Glucose 20 g, 补加适量的必须元素。固体培养基添加2%的(W/V)的琼脂粉。④反应液:每升含sucrose 34 g, 3 mol/L Sodium acetate 3 mL; ⑤染色液:每升含Sodium hydroxide 2 g, Triphenyltetrazolium 50 mg。

1.2 *OCH1*、*ALG3*和*MNN1*的敲除以及*SUC2*的表达

敲除基因的具体方法参见文献[11]。其中质粒pFA6a-his3MX为敲除*ALG3*的模板,质粒pFA6a-kanMX6为敲除*OCH1*的模板,质粒pRS306是敲除*MNN1*的模板。PCR引物见表1。基因敲除之后,将含有蔗糖酶基因(*SUC2*)的质粒pRS305Ti-Inv-FLAG插入到酿酒酵母的染色体上,首先用限制性内切酶*Afl* II对质粒pRS305Ti-Inv-FLAG进行单酶切,将酶切后的线性质粒通过胶回收后分别对出发菌株、 $\Delta och1$ 单缺陷菌株、 $\Delta alg3$ 单缺陷菌株、 $\Delta alg3\Delta och1$ 双缺陷菌株和 $\Delta alg3\Delta och1\Delta mnn1$ 三缺陷菌株进行转化,在亮氨酸平板上筛选出阳性克隆。

表 1 引物
Table 1 Primers

primer	purpose	sequence(5'→3')
F1	To delete <i>ALG3</i>	<u>CAGTATCATAGAGTGTGTATGGGAGAGAGAAAGAGTTAGATACTAGTAGTCGGATCCCCGGGTTAATTA</u>
R1	To delete <i>ALG3</i>	<u>GTATAAAGAAATGATTTAAAAACAATACGATTATATGATATTTATACATCTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC</u>
F2	To delete <i>OCH1</i>	<u>GCAATAATAGCAATTTGAAAAAGAAAGCAAGTAAAAGAAAGAAGAGATCCGGATCCCCGGGTTAATTA</u>
R2	To delete <i>OCH1</i>	<u>TAGGAATAAATTTTATTAGAGAGGGTATGATGAAAGGAGAGCCTCGTTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC</u>
F3	To delete <i>MNN1</i>	<u>TAATCTTGCGGTATTTAACGCTAGTTTAAAGAAAGTGTACTGTGTATTTAAAGCAGATTGCTACTGAGAGTG</u>
R3	To delete <i>MNN1</i>	<u>CACAAAGGCTAGTACCATAAACAGTTAGAAAAAACACTGGTTAATGCATTACTTGATTAGGGTATGGTTC</u>
F4	To check deletion of <i>OCH1</i>	CACCAGAGATTGGCACCCCTT
F5	To check deletion of <i>ALG3</i>	TGTTAATGGATTGTAGACCA
R4	To check deletion of <i>ALG3</i> and <i>OCH1</i>	CGCGCCATCA AAATGT ATGGAT
F6	To check deletion of <i>MNN1</i>	GCTACTGACATTTTGAGTTG
R6	To check deletion of <i>MNN1</i>	TCTGCTATTCTGTATACACC

Homologous arm sequences required for the deletion of gene were underlined.

1.3 蔗糖酶的活性染色

将成功插入 *SUC2* 的酿酒酵母先在 YPAD 培养基中培养 8 h 后将细胞离心收集后用 YPASuc 接着培养 3 h 后将菌液转移至 1.5 mL 的离心管中, 7000 × g 离心 5 min 收集细胞并用 50 μL 的上样缓冲液充分悬浮, 加 0.5 mm 玻璃珠至液面下 1 mm 并震荡 2 min, 12000 × g 离心 5 min 收集上清进行 SDS-PAGE 电泳。将电泳后的胶体放置于反应液中 37℃ 反应 30 min, 去离子水清洗 2 次后用染色液浸没胶体并在沸水浴中煮 3 min 进行染色观察蔗糖酶的迁移率。

1.4 生长曲线测定

平板上挑取出发菌株和三缺陷型菌株在 5 mL YPAD 液体培养基中培养至稳定期初期, 然后以 1:250 的接种量转接至 50 mL 新鲜的 YPAD 液体培养基中。每隔一段时间取 1 mL 的菌液放置于事先烘干至恒重的 1.5 mL 的离心管中, 离心收集细胞并烘干至恒重, 记录下细胞的干重。以时间为横坐标, 细胞干重为纵坐标作出生长曲线。

1.5 适应性进化

首先将三缺陷菌株接种至含有 2 mL YPAD 液体培养基的试管中于 30℃ 培养两天, 每过 8 h 向试管中加入 1 mL 新鲜的培养基以便让自发产生的基因突变得得到有效积累, 连续添加 3 次培养基后取 0.5 mL 菌液转接至另一支含有 2 mL 的新鲜培养基的试管中于 32℃ 培养。重复以上的操作依次将菌液转接后于 34℃、36℃、37℃ 培养。然后将 37℃ 条件下培养的菌液经适当稀释后取 100 μL 涂布在

YPAD 的固体培养基上于 37℃ 培养直至长出单菌落, 挑选 5 株生长最好的单菌落在 YPAD 平板上于 37℃ 连续传代 10 次以筛选到遗传性状稳定进化菌株。

1.6 *N*-糖链的 HPLC 分析

将出发菌株以及缺陷型菌株在 YPAD 液体培养基培养至对数期后期, 离心收集细胞并提取细胞壁蛋白。将细胞壁蛋白用糖肽酶 F (glycopeptidase F) 酶切以释放蛋白上的糖链, 收集纯化糖链并用 2-氨基吡啶 (2-aminopyridine) 对其进行衍生化, 然后通过 HPLC 对其进行检测。具体方法参考文献^[12]。

1.7 *N*-糖链的甘露糖苷酶处理

收集高效液相色谱中糖链的洗脱峰并于 60℃ 条件下充分干燥, 取 20 μL 浓度为 0.1 mol/L 的醋酸钠 (pH 5.0) 溶液溶解糖链。然后用 α-1, 2-甘露糖苷酶 (α-1, 2-mannosidase) 进行处理, 酶切 18 h 后离心取上清, 进行液相色谱分析。

2 结果

2.1 糖基化缺陷型酿酒酵母的构建和蔗糖酶的活性染色

出发菌株 W303a 有 6 个营养缺陷筛选标记及多个抗生素敏感性标记, 本研究分别采用组氨酸缺陷, 卡那霉素敏感性和尿嘧啶缺陷作为敲除 *ALG3*、*OCH1*、*MNN1* 的筛选标记, 利用同源重组敲除上述基因的开放阅读框 (ORF)。首先根据 GenBank 提供的酿酒酵母基因序列以及质粒模板的基因序列设

计了带有所需敲除基因 ORF 上下游两侧各 50 bp 的同源臂序列的扩增引物,引物序列见表 1。利用 R1 与 F1 为引物, pFA6a-his3MX6 为模板,通过 PCR 扩增得到的 *his3* 片段转化 W303a,在组氨酸缺陷型平板上筛选得到 $\Delta alg3$ 缺陷型菌株 (SHY101)。采用同样的方法敲除 *OCH1* 得到 $\Delta och1$ 缺陷菌株 (SHY001), $\Delta alg3\Delta och1$ 双缺陷型菌株命名为 SHY201。在菌株 SHY201 的基础上,进一步敲除 *MNN1* 构建得 $\Delta alg3\Delta och1\Delta mnn1$ 三缺陷型菌株 (SHY301)。通过 PCR 验证和基因测序对上述结果进行确认,菌株的名称及特征见表 2。

表 2. 菌株

Table 2. Strains

strains	genotype
W303a	<i>MATα ade2 - 1 ura3 - 1 his3 - 11 trp1 - 1 leu2 - 3 ,112 can1 - 100</i>
SHY001	as in W303a and $\Delta och1$
SHY101	as in W303a and $\Delta alg3$
SHY201	as in W303a and $\Delta alg3\Delta och1$
SHY301	as in W303a and $\Delta alg3\Delta och1\Delta mnn1$
SHY302	growth adaptive evolution in SHY301
SHY308	continuous subculture of SHY302

蔗糖酶含有 14 个糖基化位点,糖链的分子量将近占了整个蔗糖酶分子量的 50%^[13],因此糖基化缺陷对蔗糖酶的分子量产生较大的影响,影响蔗糖酶在凝胶电泳中的迁移率。蔗糖酶染色实验结果如图 1 所示,与出发菌株 W303a 相比 SHY001 中的蔗糖酶电泳迁移率较快和条带较窄,说明敲除 *OCH1* 后消除了外部糖链。而 SHY101 中的蔗糖酶电泳迁移率与出发菌株相近且条带较宽,说明 *ALG3* 敲除后仍然具有外部糖链; SHY201 中的蔗糖酶与 SHY001 同样具有较窄的条带但迁移率速明显快于 SHY001,表明敲除 *ALG3* 基因后,内部糖链中的甘露糖减少。分析结果表明, *OCH1* 和 *ALG3* 的敲除改变了酿酒酵母的糖基化途径,解除了其糖蛋白的高甘露糖基化倾向。SHY301 蔗糖酶电泳迁移率相比 SHY201 没有发生明显变化,可能是由于二者分子量接近,其微小差别无法在凝胶电泳中显示造成的。

2.2 $\Delta alg3\Delta och1\Delta mnn1$ 三缺陷菌株的生长和适应性进化

敲除 *ALG3*、*OCH1* 和 *MNN1* 后,酿酒酵母的生长速率会受到严重的抑制,这种有生长缺陷的酿酒酵母无法直接运用于工业生产。为了回复酿酒酵母

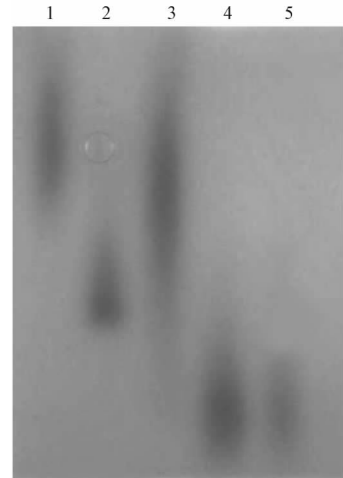


图 1. 比较来源于不同菌株的蔗糖酶在聚丙烯酰胺凝胶电泳中的迁移率

Figure 1. Comparison of electrophoretic mobility of invertase derived from different stains on SDS-PAGE. Lane 1: invertase expressed by W303a; Lane 2: invertase expressed by SHY001; lane 3: invertase expressed by SHY101; lane 4: invertase expressed by SHY201; lane 5: invertase expressed by SHY301.

生长能力,使其能够达到工业化的要求,作者通过适应性进化筛选得到一株生长速率高、耐高温、对潮霉素抗性提高的三缺陷菌株 SHY302。

作者实验得到出发菌株 W303a、SHY301 和 SHY302 的生长曲线如图 2 所示。比较出发菌株和 SHY301 的细胞生长可以发现, *ALG3*、*OCH1* 和 *MNN1* 敲除后的菌株生长缓慢, SHY301 的延滞期延长且基本上观察不到对数生长阶段。此外, SHY301 的菌体量也明显降低,即使在营养丰富的 YPAD 培养基中,稳定期 SHY301 的细胞干重也仅为出发菌株的 20%。与 SHY301 相比,经适应性进化筛选得

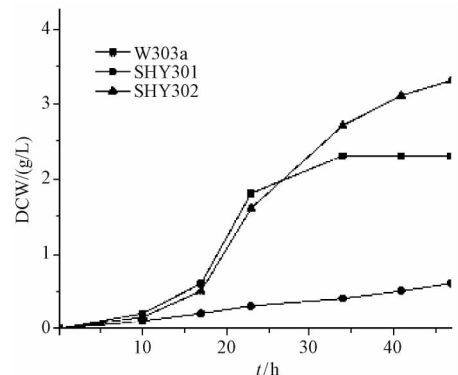


图 2. 生长曲线

Figure 2. Growth curve.

到的菌株 SHY302 延滞期明显缩短,且生长速率和菌体量显著提高,培养到 25 h 以后甚至超过出发菌株 W303a。

作者进一步研究了上述糖基化缺陷型酿酒酵母对温度的敏感性(图 3)。在 30℃ 培养时,SHY301 生长状况良好;当温度降至 25℃,SHY301 生长受到抑制,而出发菌仍能够正常生长。利用适应性进化得到的 SHY302,在 25℃ 和 30℃ 条件下都能正常生长;培养温度提高到 35℃,SHY301 细胞生长能力明显降低,而 SHY302 生长接近于出发菌株。

酿酒酵母细胞壁主要成分包括 β -葡聚糖、几丁

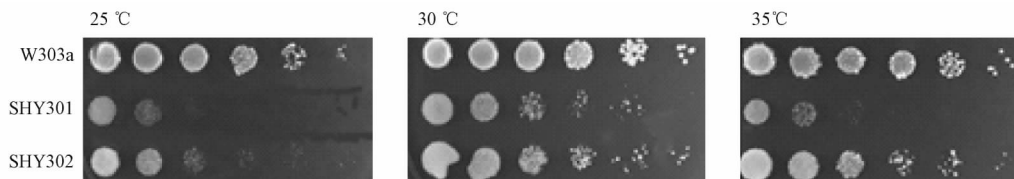


图 3. 比较不同温度下出发菌株、SHY301 和 SHY302 菌株的生长情况

Figure 3. Growth comparison of W303a, SHY301 and SHY302 under different temperature.

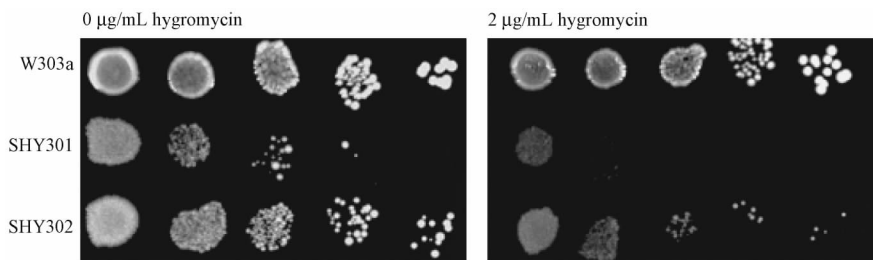


图 4. 出发菌株、SHY301 和 SHY302 在潮霉素 B 平板中的生长

Figure 4. The resistance of W303a, SHY301 and SHY302 to hygromycin B.

作者对菌株 SHY302 的生长稳定性进行了验证。将该菌株在 YPAD 液体培养基中连续转接了 6 次,通过平板划线的方式挑选出一株单菌落命名为 SHY308。出发菌株以及 SHY301、SHY302、SHY308 的平板点样结果如图 5 所示,SHY302 及 SHY308 的生长状况明显优于 SHY301,与图 3 的结果相对应。SHY308 与 SHY302 相比,生长状况没有明显区别,且对温度的适应能力和潮霉素的抗性没有发生改变(结果没有显示),表明通过适应性进化得到的 SHY302 的性状稳定,传代培养没有改变其生长特性。

2.3 糖基化缺陷型菌株的 *N*-糖链结构分析

在酿酒酵母中,糖蛋白占细胞壁干重的 40% 以上,通过提取细胞壁糖蛋白经高效液相色谱分析^[12]可以较为方便的研究 *N*-糖链。结果如图 6 所示,出

质和甘露糖蛋白等。敲除 *OCH1*、*ALG3*、*MNN1* 等与糖基化相关的基因后,细胞壁甘露糖含量降低,从而使细胞壁性状和形态发生改变,导致对潮霉素的敏感性增强^[14]。SHY301 菌株在 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的潮霉素 B 培养基中生长受到严重抑制,而 SHY302 的生长能力得到一定程度的恢复(图 4)。综上所述,通过适应性进化得到的 SHY302 相比 SHY301,生长能力更强,对温度、潮霉素的敏感性较低,接近于非糖基化缺陷的出发菌株,可以用于进一步的人源化基因工程改造。

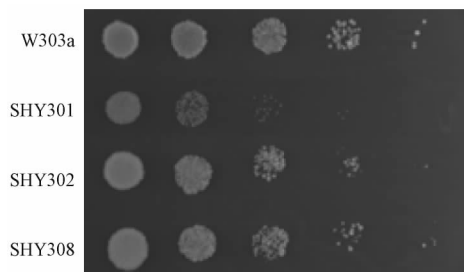


图 5. 比较出发菌株、SHY301、SHY302 及 SHY308 在 YPAD 平板上的生长情况

Figure 5. Growth comparison of W303a SHY301 SHY302 and SHY308 on YPAD palte.

发菌株 W303a 可以检测到 8 个甘露糖以上的 *N*-聚糖存在。而在 SHY201 中,作者检测到的 3 个不同的峰,对应的糖链分别为 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 、

$\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$,没有出现甘露糖个数多于 8 个的聚糖,表明 *OCH1* 和 *ALG3* 敲除后消除了外部糖链。而 $\Delta\text{alg3}\Delta\text{och1}\Delta\text{mnn1}$ 三缺陷型菌株 SHY302 出现一个较大的峰,对应的糖链为 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$,另外还有一个较小的峰,对应的结构可能为 $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ 峰消失,说明敲除 *ALG3* 和 *OCH1* 之后继续敲除 *MNN1* 可以阻止核心糖链的进一步延伸。

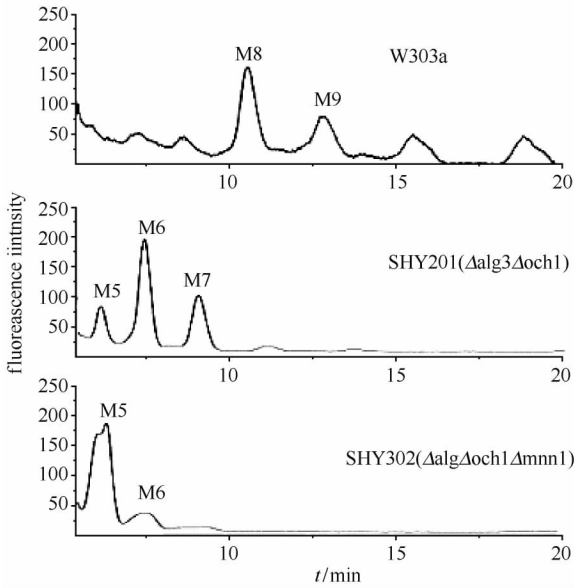


图 6. 高效液相色谱分析细胞壁糖蛋白中 *N*-糖链

Figure 6. Analyzed the *N*-linked oligosaccharide in the cell wall mannoprotein by HPLC.

构建人源化的酿酒酵母表达体系,需要得到糖基中间体 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 。作者对 SHY302 的糖链进行了体外 α -1,2-甘露糖苷酶的酶切处理。结果如图 7 所示,经 α -1,2-甘露糖苷酶处理后,糖链 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 均转化为 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$,表明在 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 中,形成 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 之后的甘露糖之间均通过 α -1,2-糖苷键进行连接。说明如能在酿酒酵母中异源表达具有活性的 α -1,2-甘露糖苷酶,可以将 SHY302 中的糖链 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$,全部截短成 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 。以上结果为研究的继续进行提供依据。

3 讨论

张大成等在 2011 年报道了对毕赤酵母 (*Pichia*

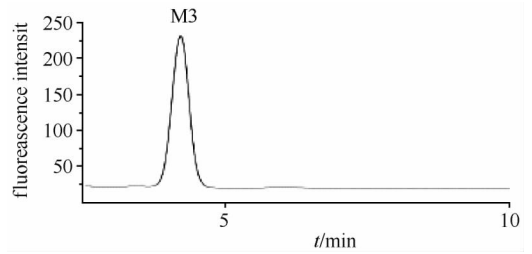


图 7. 甘露糖苷酶酶切处理鉴定 *N*-糖链结构

Figure 7. Identification of the *N*-linked oligosaccharide structure by α -1,2-mannosidase treatment.

pastoris) 的糖基化改造,通过敲除 *OCH1* 得到了能够表达低糖基化糖蛋白的毕赤酵母表达系统^[15]。2007 年,周峻岗等对酿酒酵母进行改造得到糖链结构为 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 的 $\Delta\text{och1}\Delta\text{mnn1}$ 菌株^[16]。为了获得结构更加接近于人体的糖链 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$,本研究首先对内质网中的糖基化途径进行改造,敲除 *ALG3* 得到 Δalg3 单缺陷型菌株。随后,继续敲除了 *OCH1* 得到双缺陷型菌株,高效液相色谱同时检测到 3 种不同的糖链。为了使糖链结构更为均一,我们进一步敲除 *MNN1* 得到 $\Delta\text{alg3}\Delta\text{och1}\Delta\text{mnn1}$ 三缺陷型酿酒酵母菌株,该菌株虽然能够生长,但出现了严重的生长缺陷。这种生长的缺陷限制了酿酒酵母在医药糖蛋白工业生产上的应用。2009 年, Abe 等^[17]通过在糖基化缺陷的酿酒酵母中表达一种易错 DNA 聚合酶的方式来增加酿酒酵母的突变频率,最终筛选到一株生长一定程度恢复的突变株。本研究通过较为简便的适应性进化技术对 $\Delta\text{alg3}\Delta\text{och1}\Delta\text{mnn1}$ 三缺陷型酿酒酵母菌株 SHY301 进行处理,同样筛选到一株生长恢复的 SHY302,并且该菌株生长性状能够稳定遗传。

高效液相色谱分析表明 SHY302 中主要糖链结构为 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$,还有少部分 $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 的存在,其中 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 为本研究的目标糖链。为了消除 $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 得到更为均一的糖链,作者尝试了敲除磷酸甘露糖基转移酶基因 *MNN4* 等,结果仍然可以检测到 $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 的存在(结果没有显示)。但作者对 SHY302 中的糖链进行体外 α -1,2-甘露糖苷酶切处理后得到均一的 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$,表明形成 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 之后的甘露糖之间均通过 α -1,2-糖苷键连接, $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 的存在不会影响到糖链的继续剪切。基于此,在后面的研究中,作者将进一步在酿酒酵母的内质网中表达来源于胞曲霉

(*Aspergillus saitoi*) 的 α -1,2-甘露糖苷酶,以期能够得到均一的核心型(core type)人类蛋白糖基结构 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$,并继续表达其他特异性人源化糖基转移酶,最终实现在酿酒酵母中生产人源化的糖蛋白。

综上所述,本研究得到了能够产生人类糖链中间体 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 的酿酒酵母菌株,并利用适应性进化技术大幅度提高了糖基化缺陷型菌株的细胞生长能力,为以后糖基化进一步的改造以及通过酿酒酵母生产人源化医药糖蛋白提供了一定借鉴。

参考文献

- [1] Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 1993, 3(2): 97-130.
- [2] Rudd PM, Tim Elliott, Peter Cresswell, Ian A. Wilson, Raymond A. Dwek. Glycosylation and the Immune System. *Science*, 2001, 291(5512): 2370-2376.
- [3] Sinclair AM, Elliott S. Glycoengineering: The effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005, 94(8): 1626-1635.
- [4] Sethuraman N, Stadheim TA. Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17(4): 341-346.
- [5] Hamilton SR, Gerngross TU. Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18(5): 387-392.
- [6] Lizak C, Fan YY, Weber TC, Aebi M. N-Linked Glycosylation of Antibody Fragments in *Escherichia coli*. *Bioconjugate Chemistry*, 2011, 22(3): 488-496.
- [7] De Pourcq K, De Schutter K, Callewaert N. Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(5): 1617-1631.
- [8] Wildt S, Gerngross TU. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(2): 119-128.
- [9] Graham TR, Emr SD. Compartmental organization of Golgi-specific protein modification and vacuolar protein sorting events defined in a yeast sec18 (NSF) mutant. *Journal of Cell Biology*, 1991, 114(2): 207-218.
- [10] Yip CL, Welch SK, Klebl F, Gilbert T, Seidel P, Grant FJ, O'Hara PJ, MacKay VL. Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* MNN9 and MNN1 genes required for complex glycosylation of secreted proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(7): 2723-2727.
- [11] Longtine MS, McKenzie A, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, Pringle JR. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1998, 14(10): 953-961.
- [12] Chiba Y, Suzuki M, Yoshida S, Yoshida A, Ikenaga H, Takeuchi M, Jigami Y, Ichishima E. Production of human compatible high mannose-type ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$) sugar chains in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(41): 26298-26304.
- [13] Gascon S, Neumann NP, Lampen JO. Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 1968, 243(7): 1573-1577.
- [14] Dean N. Yeast glycosylation mutants are sensitive to aminoglycosides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(5): 1287-1291.
- [15] Zhang D, Xu Y, Xin X, Zhu R, Jin J. *Pichia pastoris* X-33 with *OCH1* gene deletion and its expression of glycoprotein GM-CSF. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(5): 622-629. (in Chinese)
张大成, 许永利, 辛鑫, 朱瑞宇, 金坚. 毕赤酵母 X-33OCH1 基因敲除菌株的构建及其表达低糖基化蛋白 GM-CSF. 微生物学报, 2011, 51(5): 622-629.
- [16] Zhou J, Zhang H, Wang P, Qi C. Construction of the $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ glycosylation *Saccharomyces cerevisiae* mutant strain. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(5): 785-789. (in Chinese)
周峻岗, 张厚程, 王鹏, 祁庆生. $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 糖基化的酿酒酵母菌株的构建. 微生物学报, 2007, 47(5): 785-789.
- [17] Abe H, Takaoka Y, Chiba Y, Sato N, Ohgiya S, Itadani A, Hirashima M, Shimoda C, Jigami Y, Nakayama K. Development of valuable yeast strains using a novel mutagenesis technique for the effective production of therapeutic glycoproteins. *Glycobiology*, 2009, 19(4): 428-436.

Reconstruction of *N*-glycosylation pathway for producing human glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae*

Tiefan He^{1,2}, Sha Xu^{1,2}, Geyuan Zhang¹, Hideki Nakanishi^{1,2}, Xiaodong Gao^{1,2*}

¹School of Biotechnology, Key Laboratory of Glycobiology and Biotechnology, Ministry of Education; ²State Key Laboratory of Food Science & Technology and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] To produce human glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae*, human *N*-glycosylation pathway must be genetically engineered into the yeast cell. We tried to construct a strain, which can be used to introduce human *N*-glycosylation reactions, by disrupting several special glycosyltransferases in yeast *N*-glycosylation pathway. Furthermore, this mutant cell was applied for adaptive evolution to overcome its growth-defect phenotype. [Methods] Three yeast genes *ALG3*, *OCH1* and *MNN1* were disrupted. The *N*-linked oligosaccharides from the mutant cells were analyzed by the activity staining of invertase, and their structure was further confirmed by high-performance liquid chromatography (HPLC) and the treatment with glycosidase. Mutant cells were cultured under a high temperature for their adaptive evolution of growth.

[Results & Conclusion] We obtained a $\Delta och1\Delta alg3\Delta mnn1$ strain that produces $Man_5GlcNAc_2$ intermediate of human *N*-glycosylation. Our approach for adaptive evolution resulted a remarkable improvement on the growth phenotype of $\Delta och1\Delta alg3\Delta mnn1$ strain. In addition, we also confirmed a small amount of unexpected $Man_6GlcNAc_2$ intermediate from $\Delta och1\Delta alg3\Delta mnn1$ strain. Treatment with α -1,2-mannosidase converted both $Man_5GlcNAc_2$ and $Man_6GlcNAc_2$ products to a single $Man_3GlcNAc_2$ form, indicating that the additional mannose on $Man_6GlcNAc_2$ product comes from an α -1,2 modification. Our results demonstrate that $\Delta och1\Delta alg3\Delta mnn1$ triple mutant can be used as an initial strain to construct an yeast therapeutic glycoprotein-expression system by introducing various enzymes that are involved in human *N*-glycosylation pathway.

Keywords: humanization, *N*-glycosylation, adaptive evolution, *Saccharomyces cerevisiae*

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Key Grant Project of Chinese Ministry of Education, by the Self-determined Research Program of Jiangnan University (JUSRP211A25) and by the Open Project Program of the Key Laboratory of Industrial Biotechnology of the Ministry of Education of China (KLIB-KF201106)

* Corresponding author. Tel: +86-510-85197003; E-mail: xdgao@jiangnan.edu.cn

Received: 6 September 2013 / Revised: 9 December 2013