



细菌糖基化基本元件及其应用研究进展

李佳家¹, 周立志², 顾颖^{1,2}, 夏宁邵^{1,2}, 李少伟^{1,2*}

¹厦门大学生命科学学院, 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 福建 厦门 361102

²厦门大学公共卫生学院, 分子疫苗学与分子诊断学国家重点实验室, 福建 厦门 361102

摘要:近年来, 细菌糖基化修饰系统的研究受到了越来越广泛的关注。已有文献报道了诸多细菌糖基化修饰系统, 包括最具有代表性的空肠弯曲杆菌的 N-糖基化修饰系统以及脑膜炎奈瑟菌的 O-糖基修饰系统。本文在已有的研究基础上进行了系统的归纳总结, 讨论对细菌蛋白质糖基化系统的理解, 同时综述了细菌蛋白质糖基化应用方面的相关进展。

关键词:糖基化, 原核表达系统, 糖基转移酶, 重组疫苗

蛋白质糖基化是蛋白质多样性的来源之一。近年来, 越来越多的细菌糖基化修饰系统被发现^[1], 人们才逐渐意识到蛋白质的糖基化修饰几乎存在于各种形式的生命体内。糖不仅仅为生物体提供能量, 同时, 也在很多细胞功能中扮演重要角色, 几乎所有的生物功能都与糖分子有直接或间接的关联^[2]。蛋白质的糖基化修饰是蛋白翻译后修饰中必不可少的过程, 其存在于细胞的整个生命周期中, 并有利于促进蛋白质折叠^[3]、宿主-病原体相互作用^[4]和影响细菌毒力^[5-6]等。

尽管早在 1970 年, 人们就在革兰氏阴性细菌发现糖蛋白的存在, 但并没有引起足够的重视, 在近十几年的时间中, 科学家们又先后在空肠弯

曲杆菌、脑膜炎耐瑟菌中发现了 N-连接糖基化系统和 O-连接糖基化系统^[7-8], 并实验证明功能性 N-连接糖基化途径可以成功转移到大肠杆菌中并实现对 *acrA* 蛋白的糖基化修饰。虽然细菌的糖基化聚糖在结构上与真核生物不同^[9], 但在大肠杆菌系统中建立了通用的 N-连接糖基化途径, 为疫苗研究和工业应用提供了实现带有糖基的重组疫苗工程的可能性。本文通过对糖基化过程所涉及的供糖体、糖基转移酶、脂载体、多糖供体及受体蛋白等重要原件以及目前常用菌株进行总结归纳, 进一步提高对细菌蛋白糖基化系统复杂性的理解, 从而设计具有潜在价值的治疗性糖蛋白的疫苗。

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2014AA021302)

*通信作者。Fax: +86-592-2181258; E-mail: shaowei@xmu.edu.cn

收稿日期: 2020-04-13; 修回日期: 2020-05-27; 网络出版日期: 2020-08-07

1 原核糖基化基本元件

1.1 糖基供体

在原核生物的糖基化过程中, 细菌糖基化的单糖主要以 UDP-葡萄糖(UDP-Glc)、UDP-N-乙酰葡萄糖胺(UDP-GlcNAc)^[7]、UDP-半乳糖(UDP-Gal)、UDP-N-乙酰半乳糖胺(UDP-GalNAc)、GDP-甘露糖(GDP-Man)、GDP-岩藻糖(GDP-Fuc)等为主^[10], 与此同时还包括一些 NDP-脱氧六碳糖和许多稀有的 NDP-糖胺。2002 年, Young 等发现空肠弯曲菌寡糖链上的第一个单糖为稀有的 UDP-Bac^[11]。细菌主要糖基供体为 UDP-N-乙酰葡萄糖胺, 2004 年, Bernatchez 等提出细菌中主要糖基供体 UDP-N-乙酰葡萄糖胺由葡萄糖通过 *gne* 编码双功能 UDP-GlcNAc/Glc 4-差向异构酶催化获得^[12]; 许多杆状病毒以 UDP-葡萄糖和 UDP-半乳糖作为供糖体。

目前, 细菌的糖基供体主要依赖于直接合成和转化合成两种方式。直接合成: 重组大肠杆菌的细胞壁和胞外脂多糖的糖链主要由葡萄糖、甘露糖和 N-乙酰葡萄糖构成, 在其正常的生长代谢过程, 与其相对应的糖基供体 UDP-Glc、UDP-Man、UDP-NAcGlc 在细菌体内具有较高浓度, 因此, 完全可以满足外源糖基转移酶在重组细菌中合成寡糖链的需求。转化合成: UDP-D-Gal、GDP-L-Fuc 等糖在重组大肠杆菌体内含量很低, 很难直接合成。但在 *GMD* (编码 GDP-D-Man 的 4、6-脱氢酶)和 *GER* (GDP-L-Fuc 合成酶)2 个基因的同时催化下, GDP-D-Man 可转化为 GDP-L-Fuc, 因此, 可通过在幽门螺旋杆菌和百脉根瘤菌中克隆 *GMD* 和 *GER* 两个酶的基因, 通过在重组大肠杆菌中表达, 从而提高岩藻糖的合成效率。直接合成的应用: 2012 年 Juan D. Valderrama-Rincon

等对工程菌糖供体来源进行修饰改造, 合成人类 N-聚糖共有的核心结构甘露糖₃-N-乙酰氨基葡萄糖₂(Man₃GlcNAc₂)聚糖, 工程化大肠杆菌虽然具有高浓度的糖基供体 UDP-Man, 但其体内缺乏特异性的糖基转移酶因此, 通过将 4 种真核糖基转移酶转移至大肠杆菌中, 包括酵母尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺转移酶 Alg13 和 Alg14 以及甘露糖基转移酶 Alg1 和 Alg2, 实现了在大肠杆菌中工程化真核聚糖生物合成^[13]。转化合成的应用: 2018 年, Amael GEMadec 等人已经建立了一个多功能固相合成(SPS)平台, 用于容易地产生基于尿苷的核苷类似物^[14], 该研究可为进一步适应特定类似物提供了跳板, 并可指导对聚糖加工酶结构特征的理解, 同时为合成人类治疗性糖蛋白的原材料提供了指导方法。

1.2 糖基化载体

糖基化过程中, 糖链的合成需要一种细菌萜醇(bactoprenol, Bcp)类脂载体参与, 细菌的脂载体是一种由 11 个类异戊烯单位组成的 C55 类异戊烯醇, 它通过 2 个磷酸基与 N-乙酰胞壁酸相连, 将在细胞质中形成的胞壁酸载到细胞膜上, 形成糖链载体十一异戊烯磷酸(Und-P)^[7], 而真核生物在内质网膜中使用多萜醇焦磷酸盐(Dol-PP)作为糖链载体。2006 年, Eranthie Weerapana 等人在体外研究中, 使用亚磷酸酰胺化可由十一碳烯醇合成十一碳烯基磷酸酯, 该团队通过体外化学合成获得 Und-PP-Bac, 消除了细菌 N-连接糖基化研究中的重大障碍, 并为该过程的生物物理和生化分析铺平了道路。

同时也存在少数不依赖于脂载体十一异戊烯磷酸的细菌, 通过合酶依赖性途径在不存在脂质锚的情况下发生的一种特殊途径, 在没有膜锚的

情况下, 在多糖组装的起始中起作用的是作为信号分子的受体蛋白如双-(3'-5')-环状二聚鸟苷一磷酸(c-di-GMP)。在革兰氏阴性生物体中, 多糖通常通过另外的输出系统运输穿过外膜从而实现表面展示, 比如乳酸菌的同型多糖的起始合成以及流感嗜血杆菌 HMW1 蛋白被糖基修饰的过程。

糖基化载体主要作用是作为载体对寡糖进行组件, 是糖蛋白合成的限速因素之一, 但现有研究表明虽然真核和细菌糖基化载体分别是多萜醇焦磷酸盐(Dol-PP)和十一异戊烯磷酸(Und-P), 但它们足以发挥各自对寡糖进行组件的功能, 因此合成人类治疗性糖蛋白过程中对工程菌载体无需必要的改造。

1.3 寡糖转移酶

糖基化过程中的关键酶是寡糖转移酶, 近几年的研究中, 在不同的原核生物中发现了不同的寡糖转移酶(多种寡糖转移酶相关机制见表 1)。例如: 2002 年, Szymanski 等发现空肠弯曲菌 *pgl* 家族的寡糖转移酶 *pglB*, 将寡糖转移至受体蛋白 Asp/Glu-X-1-Asn-X+1-Ser/Thr (X-1, X+1≠Pro) 的 Asn 残基^[7]; 2007 年, Faridmoaver 等在脑膜炎奈瑟球菌中发现寡糖转移酶 *pglL*, 将寡糖或多糖转移至受体蛋白 ⁴⁵SAVTEYYLNHGE WPGNNTSAGVATSSEIK⁷³ 中第 63 位的 Ser 残基^[15-16]; 2011 年 Harvey 等在铜绿假单胞菌中发现糖基转移酶 *PilO*, 将短寡糖转移至受体蛋白丝氨酸或苏氨酸残基的氧原子^[17]; Kawai 等在流感嗜血杆菌中发现 HMW1C 蛋白是一种糖基转移酶且是具有多功能酶, 将葡萄糖和半乳糖转移到 HMW1 中选定的常规 N-连接序列基序中的天冬酰胺残基, 并且还能够产生己糖-己糖键^[18]。

近几年的研究中, 多种新型糖基转移酶被发

现。2010 年, Adrian 等在幽门螺杆菌中发现糖基转移酶 *pglB1* 负责将五糖链转移至蛋白受体的 Asn 残基上^[19]; 2011 年, Meredith 等在淋球菌中发现糖基转移酶 *PglO* 负责将三糖链转移至蛋白受体的 Ser 残基上^[20]; 2014 年, Naegeli 在胸膜肺炎放线杆菌中发现糖基转移酶 *ApNGT* 负责将 UDP-GlcNAc 或 UDP-GalNAc 转移至蛋白受体的 Asn、Gln 或 Ser 残基上^[21]; 2018 年, Avilés-Reyes 等人最新研究的变形链球菌 *pgf* 家族, 在 *pgfS-M1-E-M2* 操纵子编码糖基化途径实现对 Cnm 和 WapA 的糖基化^[5]。

寡糖转移酶在糖基化过程中具有重要作用, 但自然界中存在无需寡糖转移酶完成的糖基化。以有无寡糖基转移酶(OTase)参与的糖基化途径, 可将糖基化系统分为寡糖基转移酶(OTase)依赖性和 OTase 非依赖性。OTase 依赖的系统中, 起始葡萄糖基转移酶(GTase)将单核糖从其核苷酸激活的糖上转移到内膜细胞质面的脂质载体十一碳烯基磷酸酯(Und-P)上^[7]。细胞质 GTase 连续添加单糖至与脂质相关的碳水化合物上, 然后通过翻转酶将完整的十一异戊烯磷酸连接的聚糖翻转到内膜的周质侧, 其中 OTase 将聚糖转移至靶蛋白上的特定残基; OTase 非依赖性糖基化发生在细胞质中, 这种机制类似于内质网中发生的真核 N-连接糖基化, 与革兰氏阴性菌中脂多糖(LPS)的合成有相似之处^[22-23], 其中单糖通过 GTase 的连续作用一次一个地转移到受体蛋白上, 这些糖蛋白随后被转运到外膜或被鞭毛蛋白分泌形成自体转运蛋白^[4]。

寡糖转移酶作为糖基化过程的关键酶, 较为成熟的寡糖转移酶基因机制的发现及其放松的特异性扩展了目前用于糖工程化新型重组细菌糖蛋

表 1. 多种寡糖转移酶相关机制

Table 1. Related mechanisms of various oligosaccharide transferases

Organism	Glycosyltransferase	Type	Glycan	Site
<i>Campylobacter jejuni</i>	pglB	N-glycosylation	Heptasaccharide	D/EYNXS/T(Y, X≠P)
<i>Neisseria meningitidis</i>	pglL	O-glycosylation	Disaccharide	⁶³ SAGVA ⁶⁷
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PilO	O-glycosylation	Trisaccharide	¹⁴⁴ NCPKS ¹⁴⁸
<i>Haemophilus influenzae</i>	HMW1C	N-glycosylation	Hex and di-Hex	Asn(N)
<i>Streptococcus mutans</i>	Pgf	O-glycosylation	Monosaccharide	–
<i>Helicobacter pullorum</i>	pglB1	N-glycosylation	Pentasaccharide	Asn(N)
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	ApNGT	N-glycosylation	Monosaccharide	Asn(N)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PglO	O-glycosylation	Trisaccharide	Asn(N)

⁶³SAGVA⁶⁷ represents the specific amino acid sequence from position 63 to 67 of the receptor protein. –: none.

白的工具箱。通过基因工程手段使用寡糖转移酶基因, 有可能产生由不同蛋白质组成的糖缀合物, 2005年, Feldman等通过共表达 PglB 和编码通过十一碳烯基焦磷酸酯组装的 O 抗原胞外多糖, 成功合成 O 多糖-蛋白质缀合物, 这些重组糖蛋白可用于疫苗和细菌感染的诊断。通过对寡糖转移酶研究可指导对聚糖脱离脂载体转移至受体蛋白过程的理解, 同时共表达寡糖转移酶的蛋白聚糖耦合技术(PGCT)为合成人类治疗性糖蛋白提供了指导方法。

1.4 糖基受体

聚糖可能是细胞中最重要的分子组分之一, 被赋予多种结构和功能, 参与了许多生物学行为, 与聚糖结合的糖基受体可以是脂质、蛋白质、糖、核苷、抗生素和外源性物质等^[24]。

根据其聚糖附着识别位点可分为两种主要类型的糖基化, 分别为 N-连接糖基化和 O-连接糖基化。原核生物的 N-连接糖基化合成中, 空肠弯曲杆菌七糖链 GlcGalNAc₅Bac 在翻转酶的催化下将七糖链翻转到周质空间。在寡糖转移酶的作用下, 寡糖链连接至目标多肽的特定糖基化位点 Asp/Glu-X-1-Asn-X+1-Ser/Thr (X-1, X+1≠Pro); 原核生物 O-连接糖基化研究中, 铜绿假单胞菌寡

糖转移酶 PilO 将宿主脂多糖的 O-抗原亚基连接到特定的氨基酸序列 ¹⁴⁴NCPKS¹⁴⁸ 的 Ser148 特定位点, 脑膜炎奈瑟球菌通过 PglL O-寡糖基转移酶 (O-OTase) 将寡糖或多糖转移至受体蛋白特定氨基酸序列 ⁶³SAGVA⁶⁷ 中第 63 位的 Ser 残基^[25-26]。

通过糖基受体特定的氨基酸序列的归纳, 可指导对 N-糖基化和 O-糖基化受体蛋白的作用位点的理解, 同时可为合成人类治疗性糖蛋白的设计方案提供指导方法, 例如人为引入寡糖转移酶所特异识别的特定的氨基酸序列。

1.5 菌株

近几年的研究中, 越来越多的原核生物糖基化以及新型糖基转移酶被发现, 例如, 极端嗜热厌氧菌在 2018 年 12 月年被 Jordan Russell 团队证实可发生 O-糖基化, 并实验验证新型糖基转移酶 Cbes-1864 将糖链转移至极端嗜热厌氧菌与纤维素分解能力相关的细胞外分泌蛋白纤维素酶 A(CelA) 中 Ser 和 Thr 残基上的羟基氧上实现 O-连接糖基化^[27]。

变形链球菌被 Alejandro Avilés-Reyes 等在 2018 年 3 月预测并初步验证 pgfS 识别的蛋白靶标。首先: 通过添加由糖基转移酶 PgfM1 转运并随后由糖差向异构酶 PgfE 激活的糖来启动糖基化

过程；其次，进行初次转移，PgfS 将添加由糖基转移酶 PgfM2 运输并由糖差向异构酶 PgfE 指导 UDP-半乳糖和 UDP-葡萄糖的 NAD⁺依赖性相互转化而激活的糖，进行多次转运和添加，完成糖基化过程；最后成熟糖蛋白将被转运至细胞外环境，并通过 C 末端 LPXTG 基序的蛋白水解切割而锚定在细胞壁表面^[5]。

糖基转移酶超家族 DUF1792 由张华团队于 2014 年 7 月定义了一种新的糖基转移酶，它参与细菌 O-聚糖的生物合成。通过糖组学策略揭示一种细菌粘附素 Fap1，被具有序列 Rha1-3Glcβ1-(Glc1-3GlcNAc1-)₂-6Glcβ1-6GlcNAc 的支链六糖修饰。DUF1792 是一种金属依赖性 β-葡糖基转移酶，它在分支点将 Glc 残基转移至 Glc-GlcNAc 修饰的 Fap1。DUF1792 结构域具有罗斯曼核苷酸结合折叠，但不具有与目前注释型 GT-A 或 GT-B 折叠的糖基转移酶的任何序列和结构同一性^[28]。

这些最新研究菌株的糖基转移酶可借鉴到工程菌株中，实现在大肠杆菌中克隆通用的糖基化途径，在合成人类治疗性糖蛋白的设计方案上有望放宽对糖链以及特定识别位点的要求。

2 原核糖基化最新应用

原核系统作为蛋白质生产宿主的潜力已经逐渐扩大，以大肠杆菌为代表菌株，2002 年，Wacker 等已经证明了其糖基化蛋白质的能力。使用这种经过充分研究的细菌来改变具有寡糖结构的蛋白质是近代药代动力学一个预期的目标。然而，更伟大的目标是使用大肠杆菌体系生产人类治疗性糖蛋白，2006 年，Sethuraman 和 Stadheim 等人证实大约 70% 的人类治疗性蛋白质是糖基化修饰的，并且这些糖链的位置和类型影响其整体的生物活

性，使得糖基化修饰对治疗性蛋白质产品的功效是必需的^[29]。目前绝大部分人类治疗性蛋白是经过哺乳动物表达并进行糖基化修饰的。

大多数糖蛋白疫苗可提高蛋白的可溶性、稳定性，延长蛋白的半衰期，增强蛋白免疫原性与效价。根据生产方式的不同，可将糖蛋白结合疫苗分为：基于化学共价结合的多糖结合疫苗与细菌糖基化系统开发的结合疫苗。基于化学共价结合的多糖结合疫苗的传统生产利用复杂的合成化学方法来获得聚糖并将其缀合到蛋白质上，例如体外合成二硫键、羟基、羧基、氨基、亚氨基、巯基等特殊化学基团，首先需使用化学方法提取和纯化多糖与蛋白产物，将多糖与蛋白产物采取胺还原、活化酯、酰胺缩合等方法通过上述特殊化学基团交联后需再次纯化其最终产物。该方法步骤繁琐、耗时长、成本高、效率低，且生产的结合疫苗常存在不均一性，极大的限制了其大规模生产；细菌糖基化系统开发的结合疫苗的生产是使用蛋白聚糖耦合技术的 PGCT (体内酶促偶联)，该方法仅需在大肠杆菌表达系统中引入 3 种表达载体 (所需编码蛋白基因、糖基转移酶编码基因及合成糖链相关编码基因)，与早期的基于化学共价结合的传统多糖结合疫苗相比，细菌糖基化系统开发的结合疫苗更易于产生，成本低，效率高，且生产的结合疫苗均一稳定。本文就原核糖基化最新应用展开综述。

2.1 细菌分泌低聚糖

目前，在工业和医学方面，可溶性低聚糖具有很大的潜在价值；但这种结构具有极高的异质性。一方面：化学合成复杂且昂贵，且在异质性方面存在很大的问题；另一方面：从天然来源中分离工艺繁琐且效率低。尽管体外法和化学法被

广泛研究和改进,但对于较大的低聚糖以及较纯较高产量要求,通过该方法是不可行的。所以,代谢工程领域利用大肠杆菌菌株发酵产生人乳低聚糖的开发是该领域的重大进步,利用大肠杆菌发酵,在生长培养基中添加乳糖,可有效合成 6'-唾液酸乳糖,6,6'-二唾液酸乳糖和 6'-KDO-乳糖,当连续加入过量乳糖时,6'-唾液酸乳糖几乎是唯一可检测到的产物,并且最终浓度高达 30 g/L,6'-唾液酸乳糖是母乳中的重要成分之一,被认为在新生儿发育中起到重要作用,同时在肠道被分解,提供一种神经发育的必需营养物质唾液酸。

所以,利用该方法可生产多种具有免疫调节作用的低聚糖并用于药品和食品的开发。2015年,美国 FDA 批准利用细菌发酵 2-岩藻糖基乳糖,该低聚糖可用作婴幼儿配方奶粉的成分之一(可参见 FDA: GRN No.571),于 2017 年获欧洲批准生产。

2.2 生产针对伯克霍尔德氏菌的重组疫苗候选物

伯克霍尔德氏菌(*B. pseudomallei*)是类鼻疽病的病原体,具有很强的抗恶劣环境压力,因其在雾化时的高感染性而被归类为潜在的 B 类生物恐怖武器^[30-31],现有的减毒活细菌疫苗,存在安全性,反应原性,稳定性和制造困难等问题;全细胞灭活的细菌疫苗易于商业化生产,但存在稳定性、长期保护和生物安全风险等问题^[32];纯化的表面碳水化合物已被用作候选疫苗,但通常只产生短期保护,且对儿童或成熟个体无效。因此,2014年,Fatima Garcia-Quintanilla 等利用细菌的糖基化系统开发了结合疫苗,其中细菌表面多糖与载体蛋白化学缀合,已被证明是非常有效的。该研究中,首先构建一种缺乏 *waaL* (O-抗原连接酶)和 *wecA* (糖基转移酶)的大肠杆菌 SDB1 菌株,使用 SDB1 菌株共表达编码伯克霍尔德氏菌表达

抗原多糖的 15 个必需基因质粒、编码 *PglB* 基因质粒和编码 *AcrA* 基因质粒,经过 Ni²⁺亲和色谱纯化目的蛋白,通过 SDS-PAGE、Western blot、mass spectrometry 证实 *AcrA* 被 *B. pseudomallei* OPS II 碳水化合物糖基化,生产了细菌表面多糖与载体蛋白化学缀合,并通过免疫小鼠对 *B. pseudomallei* 的全细胞提取物的 IgG 免疫应答的 ELISA 和在 *B. pseudomallei* 的攻击中,不同测试组的小鼠存活实验表明:相比于对照组,糖缀合物 IgG 应答的显著增加,*B. pseudomallei* 的攻击试验中,实验组糖缀合物 1 μg 组中存活最长。该研究初步实验以确定糖缀合物具有用作针对 *B. pseudomallei* 的疫苗的潜力^[33]。

2.3 开发一种对土拉弗朗西斯菌的新重组糖缀合物疫苗

土拉菌病是由细胞内的土拉弗朗西斯菌 (*Francisella tularensis*)引起的,这种疾病最为严重的病是通过肺部途径获得感染,且死亡率高达 30%–60%。目前,holarctica 活疫苗株(LVS)安全性和免疫原性的 II 期临床试验仍在进行中,且其衰减的机制仍然定义不明确^[34]。因此,2018年,Marshall 等人利用细菌 N-连接糖基化将 *F. tularensis* O-抗原聚糖重组偶联到铜绿假单胞菌免疫原性载体蛋白 GtExoA,通过一个替代蛋白质结合策略使用蛋白聚糖耦合技术的 PGCT (体内酶促偶联)合成缀合疫苗,同样也引入编码受体蛋白 *ExoA* 基因质粒、编码土拉弗朗西斯菌 O-抗原多糖质粒和编码糖基转移酶 *pglB* 的质粒至大肠杆菌 CLM24 进行共表达,该研究创新于:在 *ExoA* 序列中引入了另外 8 个序列,导致蛋白质缀合物与 *F. tularensis* O-抗原糖更高度糖基化,通过动物实验测定其致死率、温度、体重、IgG 滴度、IFN γ 含量与 PBS 组、holarctica

活疫苗株比较其免疫效果, 结果表明, 该 O-抗原糖缀合物疫苗可以防止土拉弗鲁西亚菌 (*F. tularensis* Schu S4) 的气溶胶攻击, 并且将是开发保护性和获许可的人类疫苗的下一个战略步骤^[35]。

2.4 用于产生具有真核 N-糖基化的同质糖蛋白的组合方法

2010年, Flavio Schware 等人改变了 N-糖基化途径通过体内体外结合的化学偶联法以产生 (GalNAc)₅GlcNAc-Und-PP 均一的真核 N-糖蛋白。该团队修饰了 *pgl* 基因座以删除编码生物合成的基因 (*pglD*, *pglE* 和 *pglF*) 和转移 (*pglC*) 的杆菌胺, 以及添加葡萄糖分支的基因 (*pglI*), 从而引入 GlcNAc-Asn 连接以取代细菌 Bac-Asn 连接, 产生典型的真核 N-糖链的首个糖分子 GlcNAc 并连接至 Und-PP 糖基载体上, ESI-MS 分析显示成功生产出 (GalNAc)₅GlcNAc 和 (GalNAc)₆GlcNAc N-聚糖的 AcrA 糖型的混合物, 用外- α -N-乙酰半乳糖胺酶处理糖基化的 AcrA 导致逐步除去 GalNAc 残基, 得到纯的 AcrA 糖型, 其仅携带两个 GlcNAc 残基, 最后, 使用预组装的 Man₃GlcNAc₂ 噁唑啉作为模型供体底物^[36], 通过内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶转糖基作用产生携带两个 Man₃GlcNAc₂ 聚糖的均一 AcrA 糖蛋白库, 并通过 SDS-PAGE 分析、MALDI-TOF MS 验证该结果。该团队提供用于产生携带真核 N-聚糖的同质糖蛋白的潜在通用平台, 并提供了概念证据数据, 表明该方法可以扩展到真核 N-糖蛋白的产生^[37]。未来的研究将针对优化工程化的大肠杆菌表达系统, 进而提高生物医学上重要真核蛋白的糖基化效率。

2.5 在大肠杆菌中工程化生产真核糖蛋白

目前, 利用细菌表达系统衍生糖蛋白往往被限制为生物共轭疫苗或需要大量的糖蛋白在体外

修饰。在大肠杆菌中构建真核糖基化途径产生类似人类的 N-聚糖仍然是一个具有探究意义的挑战。2012年, Juan D. Valderrama-Rincon 等人在大肠杆菌中进行了合成真核糖基化蛋白的工程, 生产真核糖基化途径产生类似人类的 N-聚糖核心结构 (Man₃GlcNAc₂), 并成功将这些聚糖转移到靶蛋白的特定天冬酰胺残基上。该团队通过四种真核糖基转移酶实现聚糖生物合成, 包括酵母尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺转移酶 Alg13、Alg14 以及甘露糖基转移酶 Alg1、Alg2。通过来自空肠弯曲杆菌的寡糖基转移酶 PglB, 将聚糖成功转移至真核蛋白质^[38], 包括: (i) 人 IgG1 的 Fc 结构域在其保守的 N297 糖基化位点、(ii) 牛核糖核酸酶 A (RNaseA) 在其 N34 受体位点、(iii) 人生长激素 (hGHv) 的胎盘变体在其 N140 糖基化位点。该团队在大肠杆菌中引入构建了编码由 *ALG13*, *ALG14*, *ALG1* 和 *ALG2* 组成的合成基因簇的质粒产生功能性 Man₃GlcNAc₂ 聚糖^[39], 通过流式细胞术分析以及质谱分析确定产生与预期一致的 Man₃GlcNAc₂ 聚糖; 引入编码靶蛋白的质粒和编码 *pglB* 的质粒将真核聚糖转移至大肠杆菌中的靶蛋白, 通过比较蛋白质相对分子质量和质谱分析验证将真核聚糖 Man₃GlcNAc₂ 转移到靶蛋白上。虽然 PglB 能够将 Man₃GlcNAc₂ 转移到扩展位点 (靶标蛋白改造位点), 但不是工程或真核靶蛋白中的最小糖基化位点。沿着这些方向, 期望通过应用新的糖体展示技术 (包括细胞表面和噬菌体展示系统) 来实现进一步的改进。需要这样的方法来产生有效糖基化最小 NXS/T 受体位点的细菌 OTase 变体^[13]。

2.6 用于产生含有人类 O-连接的聚糖的治疗性蛋白质

将合成生物学应用于重编程大肠杆菌 (提供

氧化细胞质环境的 SHuffle 菌株,且含有组成型表达的细胞质二硫键异构酶(DsbC)^[39]以制备人类型聚糖,从而克服必须用真核系统进行发酵以产生这些蛋白质的诸多障碍。2019年, Ting Du 等人使用双质粒方法:一种编码治疗性靶标蛋白质细胞因子干扰素- α 2b(hIFN- α 2b)和人生长激素(hGH)^[40],另一种编码 O-糖基化所需的酶促机制。酶促机制包括编码人多肽的 N-乙酰半乳糖转移酶、编码空肠弯曲杆菌 β -1,3 半乳糖基转移酶、UDP-Glc(NAc)-4-差向异构酶和细菌的二硫化物键异构酶。在体外天然或设计的位点进行 O-糖基化,通过用荧光唾液酸衍生物、完整蛋白质相对分子质量、对 T-Ag 进行特异性酶标记、光谱分析和 HPLC 对未改造的原始大肠杆菌和不同程度糖基化改造的大肠杆菌表达的治疗性靶标蛋白质进行分析比较。结果表明使用双质粒方法表达的靶标蛋白通过选择包含在合成 pOGO 操纵子中的酶在体内糖基化,该团队建立了一个细菌表达平台,用于生产带有人类 O-连接的核心-1 聚糖的治疗剂,且进一步改进构建体以优化和扩展聚糖与其他类型的糖基转移酶的复杂性,然而找到提供可溶性和完全糖基化的生物活性物质值得科研工作者深入探究^[41]。

3 小结和展望

目前,大约 70%的人类治疗性蛋白质是糖基化修饰的,并且糖链的位置和类型影响其整体的生物活性,使得糖基化修饰对治疗性蛋白质产品的功效是必需的。人类治疗性糖蛋白主要在哺乳动物细胞系中产生,但随着世界人口的增加,人类治疗的需求也在增加,已经出现哺乳动物细胞培养昂贵的压力。因此,必须开发快速生产的替

代系统,从而改善哺乳动物细胞原料昂贵、培养物的产量低下、培养生产耗时长等问题。

为开发快速生产的替代系统,原核生物的糖基化系统受到了越来越广泛的研究,研究发现,以大肠杆菌为首的原核系统具有得天独厚的优势:首先,培养成本低廉;其次,生长传代快速;此外,不易被其他病毒感染;同时,它是一个相对更简单的系统,控制糖基化产物的异质性比真核系统问题更少,且与早期的基于化学共价结合的传统多糖结合疫苗相比,细菌糖基化系统开发的结合疫苗更易于产生,成本低,效率高,且生产的结合疫苗均一稳定。

研究发现,原核蛋白糖基化修饰需要被催化成核苷二磷酸(NDP-)活化作为供糖体合成多糖链,合成多糖链可分为:Wzy 依赖性途径、ATP 结合盒(ABC)转运蛋白依赖性途径和合酶依赖性途径三种途径,以细胞膜上的脂载体十一异戊烯磷酸(Und-P)为非必需糖载体,通过寡糖转移酶、糖基转移酶、翻转酶等多酶协同将多糖或单糖运输至受体靶蛋白特点位点,实现蛋白翻译后修饰,蛋白糖基化往往可使蛋白质能够抵抗消化酶的作用;赋予蛋白质传导信号的功能,某些蛋白只有在糖基化之后才能正确折叠等诸多优势。

最近在工业和医学方面,可溶性低聚糖具有很大的潜在价值:2010年, Drouillard 等通过降低唾液酸转移酶基因的表达水平并增加 *neuABC* 基因的表达水平,生产出具有免疫调节作用的低聚糖并用于药品和食品的开发;2015年,美国 FDA 批准利用细菌发酵 2-岩藻糖基乳糖用作婴幼儿配方奶粉的成分之一。疫苗应用方面:2013年 Jon Cuccui 等人通过一个替代蛋白质结合策略使用蛋白聚糖耦合技术的 PGCT(体内酶促偶联)合成土拉菌病重组糖缀合物疫苗;2014年

Garcia-Quintanilla 等利用细菌 N-糖基化机制系统并结合蛋白聚糖耦合技术的 PGCT 开发了传统的针对伯克霍尔德氏菌的重组疫苗候选物；2019 年, Ting 等使用双质粒方法, 建立了一个细菌表达平台, 用于生产带有人类 O-连接的核心-1 聚糖的治疗剂。合成真核 N-糖基化同质糖蛋白方面: 2010 年, Flavio Schwarz 等通过体内体外结合的化学偶联法以产生(GalNAc)₅GlcNAc-Und-PP 均一的真核 N-糖蛋白；2015 年, Akkaraphol Srichaisupakit 等通过四种真核糖基转移酶合成真核聚糖, 并通过来自空肠弯曲杆菌的寡糖基转移酶 PglB 成功将合成真核聚糖转移至真核蛋白质, 该项研究是原核生物生产真核糖基化蛋白的里程碑。

对原核生物糖基化研究进展中, 虽然实现了利用细菌糖基化机制并结合蛋白聚糖耦合技术的 PGCT 开发了多种重组疫苗候选物, 并在开发大肠杆菌作为生产人类治疗性蛋白质工厂方面取得了很大进展, 但在产生高效稳定的生产系统方面仍然存在多重障碍。首先是对原核生物糖基化系统研究的局限性, 相关寡糖转移酶发挥机制的糖供体存在不定性, 且蛋白修饰位点范围宽泛, 至今仍未精确到有效糖基化最小受体位点; 其次, 真核生物糖基酶的作用机制背景不清晰, 由于原核生物缺乏内质网、高尔基体等糖基化相关的细胞器, 真核生物糖基酶转移至原核生物能否发挥其功能有待进一步研究验证; 最后, 上述大多数研究都是基于实验室规模进行的, 而且对于转化应用于工业生产中至关重要的定量信息是非常有限的, 同时, 在已有研究基础上生产出的重组疫苗候选物需要通过漫长的临床试验进行进一步验证其免疫原性。

参考文献

- [1] Nothaft H, Szymanski CM. Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(11): 765–778.
- [2] Nothaft H, Szymanski CM. Bacterial protein N-glycosylation: new perspectives and applications. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(10): 6912–6920.
- [3] Helenius A, Aebi M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annual Review of Biochemistry*, 2004, 73: 1019–1049.
- [4] Valguarnera E, Kinsella RL, Feldman MF. Sugar and spice make bacteria not nice: protein glycosylation and its influence in pathogenesis. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(16): 3206–3220.
- [5] Aviles-Reyes A, Freires IA, Besingi R, Purushotham S, Deivanayagam C, Brady LJ, Abranches J, Lemos JA. Characterization of the *pgf* operon involved in the posttranslational modification of *Streptococcus mutans* surface proteins. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 4705.
- [6] Napiorkowska M, Boilevin J, Sovdat T, Darbre T, Reymond JL, Aebi M, Locher KP. Molecular basis of lipid-linked oligosaccharide recognition and processing by bacterial oligosaccharyltransferase. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2017, 24(12): 1100–1106.
- [7] Olivier NB, Chen MM, Behr JR, Imperiali B. *In vitro* biosynthesis of UDP-*N,N'*-diacetyl bacillosamine by enzymes of the *Campylobacter jejuni* general protein glycosylation system. *Biochemistry*, 2006, 45(45): 13659–13669.
- [8] Sharon N. Celebrating the golden anniversary of the discovery of bacillosamine, the diamino sugar of a *Bacillus*. *Glycobiology*, 2007, 17(11): 1150–1155.
- [9] Kowarik M, Young NM, Numao S, Schulz BL, Hug I, Callewaert N, Mills DC, Watson DC, Hernandez M, Kelly JF, Wacker M, Aebi M. Definition of the bacterial N-glycosylation site consensus sequence. *The EMBO Journal*, 2006, 25(9): 1957–1966.
- [10] Azadi P, Heiss C. Mass spectrometry of N-linked glycans//Karlsson NG, Packer NH. *Glycomics: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2009: 37–51.
- [11] Young NM, Brisson JR, Kelly J, Watson DC, Tessier L, Lanthier PH, Jarrell HC, Cadotte N, St Michael F, Aberg E, Szymanski CM. Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium,

- Campylobacter jejuni*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(45): 42530–42539.
- [12] Bernatchez S, Szymanski CM, Ishiyama N, Li JJ, Jarrell HC, Lau PC, Berghuis AM, Young NM, Wakarchuk WW. A single bifunctional UDP-GlcNAc/Glc 4-epimerase supports the synthesis of three cell surface glycoconjugates in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(6): 4792–4802.
- [13] Valderrama-Rincon JD, Fisher AC, Merritt JH, Fan YY, Reading CA, Chhiba K, Heiss C, Azadi P, Aebi M, DeLisa MP. An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology*, 2012, 8(5): 434–436.
- [14] Madec AGE, Schocker NS, Sanchini S, Myratgeldiyev G, Das D, Imperiali B. Facile solid-phase synthesis and assessment of nucleoside analogs as inhibitors of bacterial UDP-sugar processing enzymes. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(9): 2542–2550.
- [15] Sun P, Pan C, Zeng M, Liu B, Liang HY, Wang DS, Liu XK, Wang B, Lyu Y, Wu J, Zhu L, Wang HL. Design and production of conjugate vaccines against *S. Paratyphi A* using an O-linked glycosylation system *in vivo*. *NPJ Vaccines*, 2018, 3(1): 4.
- [16] Faridmoayer A, Fentabil MA, Mills DC, Klassen JS, Feldman MF. Functional characterization of bacterial oligosaccharyltransferases involved in O-linked protein glycosylation. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(22): 8088–8098.
- [17] Harvey H, Kus JV, Tessier L, Kelly J, Burrows LL. *Pseudomonas aeruginosa* D-arabinofuranose biosynthetic pathway and its role in type IV pilus assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(32): 28128–28137.
- [18] Kawai F, Grass S, Kim Y, Choi KJ, St Geme III JW, Yeo HJ. Structural insights into the glycosyltransferase activity of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* HMW1C-like protein. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(44): 38546–38557.
- [19] Jervis AJ, Langdon R, Hitchen P, Lawson AJ, Wood A, Fothergill JL, Morris HR, Dell A, Wren B, Linton D. Characterization of N-linked protein glycosylation in *Helicobacter pullorum*. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(19): 5228–5236.
- [20] Hartley MD, Morrison MJ, Aas FE, Børud B, Koomey M, Imperiali B. Biochemical characterization of the O-linked glycosylation pathway in *Neisseria gonorrhoeae* responsible for biosynthesis of protein glycans containing *N,N'*-diacetylglucosamine. *Biochemistry*, 2011, 50(22): 4936–4948.
- [21] Naegeli A, Neupert C, Fan YY, Lin CW, Poljak K, Papini AM, Schwarz F, Aebi M. Molecular analysis of an alternative *N*-glycosylation machinery by functional transfer from *Actinobacillus pleuropneumoniae* to *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(4): 2170–2179.
- [22] Hug I, Feldman MF. Analogies and homologies in lipopolysaccharide and glycoprotein biosynthesis in bacteria. *Glycobiology*, 2011, 21(2): 138–151.
- [23] Aebi M. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2013, 1833(11): 2430–2437.
- [24] Wells L, Feizi T. Editorial overview: carbohydrates: O-glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*, 2019, 56: iii–v.
- [25] Faridmoayer A, Fentabil MA, Haurat MF, Yi W, Woodward R, Wang PG, Feldman MF. Extreme substrate promiscuity of the *Neisseria* oligosaccharyl transferase involved in protein O-glycosylation. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(50): 34596–34604.
- [26] Musumeci MA, Hug I, Scott NE, Ielmini MV, Foster LJ, Wang PG, Feldman MF. *In vitro* activity of *Neisseria meningitidis* PglL O-oligosaccharyltransferase with diverse synthetic lipid donors and a UDP-activated sugar. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(15): 10578–10587.
- [27] Zhang H, Zhu F, Yang TD, Ding L, Zhou MX, Li JZ, Haslam SM, Dell A, Erlandsen H, Wu H. The highly conserved domain of unknown function 1792 has a distinct glycosyltransferase fold. *Nature Communications*, 2014, 5(1): 4339.
- [28] Russell J, Kim SK, Duma J, Nothaft H, Himmel ME, Bomble YJ, Szymanski CM, Westpheling J. Deletion of a single glycosyltransferase in *Caldicellulosiruptor bescii* eliminates protein glycosylation and growth on crystalline cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11(1): 259.
- [29] Sethuraman N, Stadheim TA. Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17(4): 341–346.
- [30] Silva EB, Dow SW. Development of *Burkholderia mallei*

- and *pseudomallei* vaccines. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2013, 3: 10.
- [31] Price EP, Sarovich DS, Mayo M, Tuanyok A, Drees KP, Kaestli M, Beckstrom-Sternberg SM, Babic-Sternberg JS, Kidd TJ, Bell SC, Keim P, Pearson T, Currie BJ. Within-host evolution of *Burkholderia pseudomallei* over a twelve-year chronic carriage infection. *mBio*, 2013, 4(4): e00388–13.
- [32] Galen JE, Curtiss III R. The delicate balance in genetically engineering live vaccines. *Vaccine*, 2014, 32(35): 4376–4385.
- [33] Garcia-Quintanilla F, Iwashkiw JA, Price NL, Stratilo C, Feldman MF. Production of a recombinant vaccine candidate against *Burkholderia pseudomallei* exploiting the bacterial N-glycosylation machinery. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 381.
- [34] Golovliov I, Twine SM, Shen H, Sjostedt A, Conlan W. A *AclpB* mutant of *Francisella tularensis* subspecies holarctica strain, FSC200, is a more effective live vaccine than *F. tularensis* LVS in a mouse respiratory challenge model of tularemia. *PLoS One*, 2013, 8(11): e78671.
- [35] Marshall LE, Nelson M, Davies CH, Whelan AO, Jenner DC, Moule MG, Denman C, Cuccui J, Atkins TP, Wren BW, Prior JL. An O-antigen glycoconjugate vaccine produced using protein glycan coupling technology is protective in an inhalational rat model of tularemia. *Journal of Immunology Research*, 2018, 2018: 8087916.
- [36] Ochiai H, Huang W, Wang LX. Expeditious chemoenzymatic synthesis of homogeneous N-glycoproteins carrying defined oligosaccharide ligands. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(41): 13790–13803.
- [37] Schwarz F, Huang W, Li CS, Schulz BL, Lizak C, Palumbo A, Numao S, Neri D, Aebi M, Wang LX. A combined method for producing homogeneous glycoproteins with eukaryotic N-glycosylation. *Nature Chemical Biology*, 2010, 6(4): 264–266.
- [38] Pandhal J, Wright PC. N-Linked glycoengineering for human therapeutic proteins in bacteria. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(9): 1189–1198.
- [39] Van Patten SM, Hughes H, Huff MR, Piepenhagen PA, Waire J, Qiu HW, Ganesa C, Reczek D, Ward PV, Kutzko JP, Edmunds T. Effect of mannose chain length on targeting of glucocerebrosidase for enzyme replacement therapy of *Gaucher disease*. *Glycobiology*, 2007, 17(5): 467–478.
- [40] Cai YP, Xu MX, Yuan ML, Liu ZG, Yuan WE. Developments in human growth hormone preparations: sustained-release, prolonged half-life, novel injection devices, and alternative delivery routes. *International Journal of Nanomedicine*, 2014, 9(1): 3527–3538.
- [41] Du T, Buenbrazo N, Kell L, Rahmani S, Sim L, Withers SG, DeFrees S, Wakarchuk W. A bacterial expression platform for production of therapeutic proteins containing human-like O-linked glycans. *Cell Chemical Biology*, 2019, 26(2): 203–212.e5.

Fundamental elements of bacterial glycosylation system

Jiajia Li¹, Lizhi Zhou², Ying Gu^{1,2}, Ningshao Xia^{1,2}, Shaowei Li^{1,2*}

¹ National Institute of Diagnostics and Vaccine Development of Infectious Diseases, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian Province, China

² State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian Province, China

Abstract: In recent years, glycosylation modification system in bacteria has attracted more and more attention in both academic and industrial fields. Numerous glycosylation modification systems in bacteria have been reported, the most representative cases are N-glycosylation modification system in *Campylobacter jejuni* and O-glycosylation modification system in *Neisseria meningitidis*. This review systematically summarizes the glycosylation modification system in bacteria to better understand this system and enlists the situation of the application using the protein glycosylation modification system in bacteria. At the same time, we provide some theoretical knowledges and examples for the design of virus-like particle-based vaccines where glycosylation is required.

Keywords: glycosylation, prokaryotic expression system, glycosyltransferases, recombinant vaccine

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National High-Tech Research and Development Plan (2014AA021302)

*Corresponding author. Fax: +86-592-2181258; E-mail: shaowei@xmu.edu.cn

Received: 13 April 2020; Revised: 27 May 2020; Published online: 7 August 2020