

## 蛋白酶抗性人睫状神经营养因子突变体基因的构建及其在巴斯德毕赤酵母中的表达

赵洪亮 薛 冲 熊向华 张 伟 朱厚础 刘志敏\*

(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071)

**摘 要** AX15 是一种比天然睫状神经营养因子具有更高的生物学活性、更好的稳定性和可溶性的 hCNTF 突变体。在巴斯德毕赤酵母中表达时 AX15 易发生降解。氨基酸序列分析表明降解位于由 12 和 13 位氨基酸残基组成的双碱性氨基酸之后。根据 KEX2 蛋白酶的底物专一性把双碱性氨基酸从 RR 变为 RK 构建了 KEX2 抗性的 AX15 突变体 AX15(R13K)。AX15(R13K) 的稳定性得到了显著的提高,在诱导 100 h 后也未发生降解。利用超滤浓缩和凝胶过滤得到了纯度 >90% 的 AX15(R13K)。TF-1 细胞存活实验表明 AX15(R13K) 具有与 AX15 相同的生物学活性。蛋白酶抗性人睫状神经营养因子突变体可能具有更好的体内稳定性,在临床应用上具有潜在的优势。

**关键词** 睫状神经营养因子,巴斯德毕赤酵母,蛋白酶抗性

**中图分类号** Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)03-0394-04

睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)是一种具有多种生物学功能的细胞因子: CNTF 能促进感觉神经元、运动神经元、大脑神经元和海马神经元的存活;另外有一些外周组织如骨骼肌也对 CNTF 有反应<sup>[1]</sup>。AX15 是由 Regeneron 公司发明的 hCNTF 的一个三重突变体:17 位的 Cys 被 Ala 替换,63 位的 Gln 被 Arg 替换,并缺失了 C 末端的 15 个氨基酸。与天然 hCNTF 相比,AX15 具有更高的生物学活性,更好的稳定性和可溶性<sup>[1]</sup>。重组人 CNTF(rhCNTF)曾被用来治疗肌萎缩侧索硬化症(ALS),但因副反应太大及疗效不确切而终止了临床实验<sup>[2]</sup>。最近研究表明 CNTF 可通过激活位于下丘脑的受体而对机体的体重设定点(set-point)进行调节,从而起到减少摄食、减轻体重的作用<sup>[3]</sup>。目前 AX15 已完成肥胖症的 III 期临床实验,并取得了统计学上具有显著性差异的结果<sup>[4]</sup>。为了在巴斯德毕赤酵母中表达 AX15,利用重组 PCR 技术从人外周血基因组中克隆了 hCNTF 基因,并通过定点突变技术构建了 AX15 基因。但在表达过程中发现 AX15 易被降解。氨基酸序列分析表明降解位于由 12 和 13 位氨基酸残基组成的双碱性氨基酸之后。根据

KEX2 蛋白酶的底物专一性把双碱性氨基酸从 RR 变为 RK,构建了 KEX2 抗性的 AX15 突变体 AX15(R13K),并使其在巴斯德毕赤酵母中进行了表达。

### 1 材料与方法

#### 1.1 质粒、菌株、细胞株

AX15 表达载体 pPIC9-AX15 由本课题组构建,巴斯德毕赤酵母宿主菌 GS115 购自 Invitrogen 公司,大肠杆菌 TG1 为本室保存。AX15(R13K)测活用细胞 TF-1 由本室保存。

#### 1.2 工具酶与试剂

所用的限制性内切酶 *EcoR* I, *Xho* I, *Bgl* II 为大连宝生物工程公司产品。Taq DNA 聚合酶购自华美生物工程公司。Pfu DNA 聚合酶购自上海生工生物工程有限公司。酵母抽提物、蛋白胨购自 Oxoid 公司。酵母基本氮源 YNB 购自 Difco 公司。其余试剂为国产或进口分析纯试剂。重组人 CNTF(rhCNTF)标准品购自 Peprotech 公司。

#### 1.3 纯化设备

中试层析仪 BioPilot 和 Superdex75 prep grade(26/60)层析柱为 Pharmacia 公司产品。VivaFlow50 超滤膜

包(截留分子量为 10kD)购自 Vivascience 公司。

1.4 酵母宿主菌的转化、表达菌株的筛选及工程菌表达实验

按 Invitrogen 公司说明书进行。

1.5 AX15 降解位点的确定

AX15 表达产物进行 SDS-PAGE 后将全长分子和降解产物通过电转移至 PVDF 膜上,送军事医学科学院仪器中心进行 N-端序列测定。根据 AX15 的氨基酸序列及降解产物 N-端 5 个氨基酸序列确定 AX15 降解位点。

1.6 AX15(R13K)基因的构建

用引物 1:5'CC CTC GAG AAA AGA GCT TTC ACA GAG CAT TCA CCG CTG ACC CCT CAC CGT AAG GAC 3' 及引物 2 5'GG GAA TTC CTA TTA CCC AGT CTG ATG AGA AGA AAT 3'以 pPIC9-AX15 为模板扩增出 AX15(R13K)基因。

1.7 AX15(R13K)的纯化

先用超滤膜包把培养上清浓缩 10 倍,然后用 Superdex75 进行凝胶过滤层析。凝胶过滤所用缓冲液为 50mm/L Tris·HCl(pH8.0),250mm/L NaCl,0.1% Tween80,2.5mm/L EDTA。

1.8 AX15(R13K)的活性测定

利用 TF-1 细胞测定 AX15(R13K)的促细胞存活活性,具体方法参考文献[5],但最后不是用<sup>3</sup>H 掺入法而是用 MTT 检测存活的细胞数量。

1.9 蛋白定量

对于培养上清中的目的蛋白的定量采用定量凝胶扫描法,纯化后的样品用 Lowry 法进行蛋白含量测定。

2 结果

2.1 AX15 在巴斯德毕赤酵母中的表达

取不同诱导时间的 AX15 表达培养上清进行 SDS-PAGE,电泳结果见图 1。

电泳结果表明 AX15 在巴斯德毕赤酵母中表达时存在明显的降解条带,且降解产物在表达的早期(诱导 12h)就存在,提示 AX15 的降解是一种胞内降解。

2.2 AX15 降解位点的确定

对 AX15 及其降解产物分别进行 N-端序列测定,结果见图 2。

N-端序列分析结果表明分子量较大的条带是完整的 AX15 分子,而分子量较小的条带是缺失了 N-端 13 个氨基酸的降解产物。

2.3 AX15(R13K)基因的克隆

利用引物 1 及引物 2 以 pPIC9-AX15 为模板扩增出 AX15(R13K)基因,结果见图 3。利用引物 1 将第 13 位精氨酸(R)突变为赖氨酸(K)。

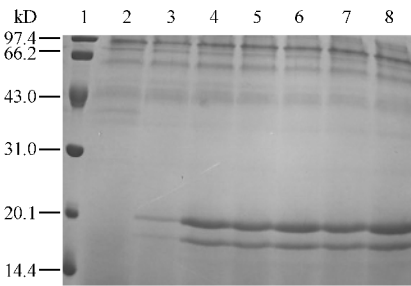


图 1 AX15 在巴斯德毕赤酵母中的表达

Fig.1 Expression of AX15 in *Pichia pastoris*

1:marker;2: before induction;

3~8:12,24,36,48,60,72 hours post-induction

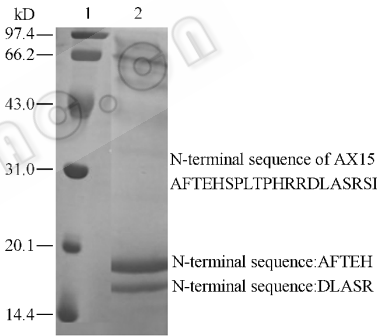


图 2 AX15 及其降解产物的 N-端氨基酸序列分析

Fig.2 N-terminal amino acid sequencing of intact and degraded AX15

1:marker 2:cultural supernatant of AX15 expressing strain

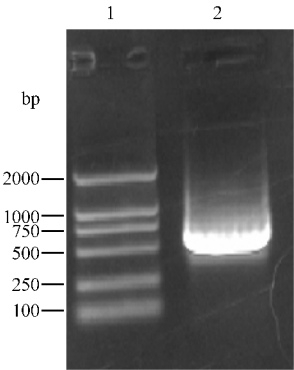


图 3 AX15(R13K)基因的克隆

Fig.3 Cloning the gene encoding AX15(R13K)

1:DL2000 marker 2:AX15(R13K)gene

2.4 AX15(R13K)在巴斯德毕赤酵母中的表达

取不同诱导时间的 AX15(R13K)表达培养上清进行 SDS-PAGE,电泳结果见图 4。

电泳结果表明 AX15( R13K )的稳定性得到了显著的提高 ,在诱导 120h 后也未发生降解。

2.5 AX15( R13K )的纯化

AX15( R13K )经超滤和凝胶过滤两步纯化后纯度即可 > 90%。取纯化前及经各步纯化的样品进行 SDS-PAGE 结果见图 5。

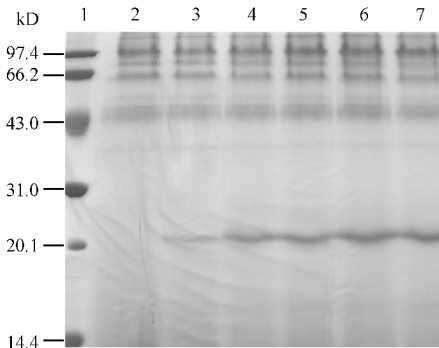


图 4 AX15( R13K )在巴斯德毕赤酵母中的表达

Fig.4 Expression of AX15( R13K ) in *Pichia pastoris*

1 marker ; 2 before induction ;  
3 ~ 7 24 48 72 96 120 hours post-induction

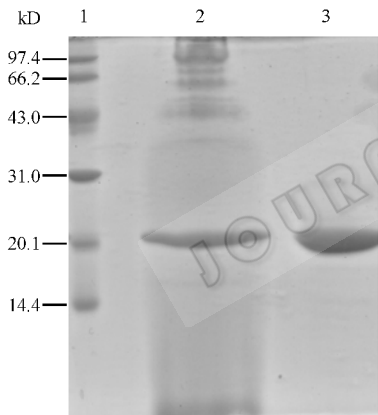


图 5 AX15( R13K )的纯化

Fig.5 Purification of AX15( R13K )

1 marker 2 concentrated supernatant 3 : eluent from Superdex75 gel filtration chromatography

2.6 AX15( R13K )的活性测定

TF-1 是人类红白细胞瘤细胞系。高浓度的 CNTF 能促进 TF-1 细胞的存活。AX15( R13K )活性测定结果见图 6。图中各点均为 4 次重复实验的平均值。

TF-1 细胞存活实验显示 AX15( R13K )的  $EC_{50}$  约为 200ng/mL ,是 rhCNTF 的 4 倍 ,与 AX15 相当。

3 讨论

由于具有表达水平高、操作简单等优点 ,近年来

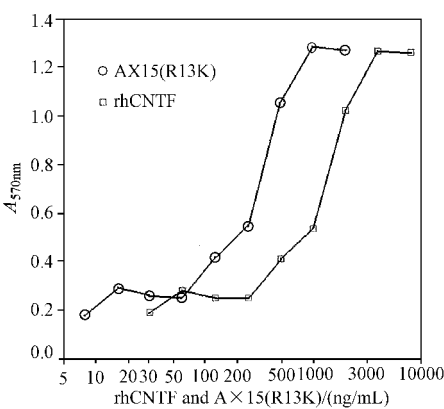


图 6 AX15( R13K )的活性测定

Fig.6 TF-1 cell survival bioassay of AX15( R13K )

巴斯德毕赤酵母表达系统得到了迅速的发展<sup>[6]</sup>。目前已有数百种外源基因在这个表达系统里得到了表达。其中表达水平最高的明胶蛋白的表达量已经达到 15g/L<sup>[7]</sup>。但是 ,巴斯德毕赤酵母对于表达产物的降解也一直是困扰研究者的一个难题。表达产物的降解不但会减少目的蛋白的表达水平 ,而且由于降解产物与完整分子的理化性质往往较为接近 ,还会降低表达产物的回收率。根据降解发生的部位可分为胞内降解和胞外降解。胞外降解是指表达产物被分泌至培养基中后发生的降解。目前已有多种技术和方法用来防止或减少表达产物的胞外降解 :如降低诱导过程的 pH 值<sup>[7]</sup>和/或温度 ,在培养基中添加酪蛋白水解物<sup>[8]</sup>等。胞内降解是指表达产物在分泌过程中被分泌途径中的蛋白酶降解。巴斯德毕赤酵母分泌途径内存在着许多以单碱性或双碱性氨基酸为作用位点的蛋白酶 ,如 KEX1 和 KEX2 等。与胞外降解不同 ,胞内降解基本上不受培养条件的影响。防止目的蛋白胞内降解的方法有剔除使目的蛋白发生降解的蛋白酶<sup>[9]</sup>和消除目的蛋白上的降解位点<sup>[10]</sup>。

CNTF 是一个极易发生降解的分子。Lin 等从兔坐骨神经分离 CNTF<sup>[11]</sup>以及 Jordan 等在大肠杆菌中表达 AX15<sup>[12]</sup>过程中都观察到了 CNTF 的降解产物。Lin 等推测降解发生在由 12 和 13 位氨基酸残基组成的双碱性氨基酸位点之后 ,Jordan 等未对降解产物进行鉴定。本研究通过氨基酸序列分析确定了降解发生的位点。由于降解位点位于双碱性氨基酸之后 ,且降解产物与完整分子同时被分泌到培养基中 ,所以使 AX15 发生降解的蛋白酶极有可能是 KEX2 蛋白酶。因为 KEX2 在信号肽的正确加工中是必不可少的 ,故不能通过剔除 KEX2 来防止 AX15 的降解 ,只能通过消除目的蛋白上的降解位点来防止

AX15 的降解。根据 KEX2 蛋白酶的底物专一性<sup>[13]</sup>把双碱性氨基酸从 RR 变为 RK, 构建了 KEX2 抗性的 AX15 突变体-AX15(R13K)。研究表明 AX15(R13K) 的稳定性得到了显著的提高, 在诱导 120 h 后也未发生降解。虽然 AX15(R13K) 在摇瓶中的表达水平与 AX15 相当, 均约为 10mg/L, 但 AX15(R13K) 更易于纯化。经超滤和凝胶过滤两步纯化后纯度即可 >90%, 回收率大于 60%。而且由于酵母中的 KEX2 蛋白酶与哺乳动物体内的 PC1/3、PC2 等蛋白酶具有相似的底物专一性<sup>[13]</sup>, 蛋白酶抗性人睫状神经营养因子突变体不但具有更高的回收率, 而且还可能具有更好的体内稳定性, 在临床应用上具有潜在的优势。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Sleeman MW, Anderson KD, Lambert PD *et al.* The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR $\alpha$ . *Pharma Acta Helv*, 2000, **74**(2): 265 – 272
- [ 2 ] Miller RG, Petajan JH, Bryan WW *et al.* A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic factor (rhCNTF) in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol*, 1996, **39**(2): 256 – 260
- [ 3 ] Lambert PD, Anderson KD, Sleeman MW *et al.* Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(8): 4652 – 4657
- [ 4 ] Regeneron Press Release. Recently Completed Phase III Trial Suggests Early Weight Loss Identifies Patients Likely to Benefit the Most from AXOKINE Treatment. [www.regeneron.com](http://www.regeneron.com) 2003-05-19
- [ 5 ] Saggio I, Gloaguen I, Poiana G *et al.* CNTF variants with increased biological potency and receptor selectivity defined a function site of receptor interaction. *The EMBO J*, 1995, **14**(13): 3045 – 3054
- [ 6 ] Huang YS(黄岩山), Dong Y(董勇), Li H(李辉) *et al.* Purification and characterization of recombinant human interleukin 11 which expressed by *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)* 2001, **17**(3): 250 – 253
- [ 7 ] Werten MWT, Bosch TTVD, Wind RD *et al.* High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast*, 1999, **15**(6): 1087 – 1096
- [ 8 ] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Review*, 2000, **24**(1): 45 – 66
- [ 9 ] Boehm T, Pirie SS, Trinh LB *et al.* Disruption of the KEX1 gene in *Pichia pastoris* allows expression of full-length murine and human endostatin. *Yeast*, 1999, **15**(3): 563 – 572
- [ 10 ] Deeley, Michael C, Price *et al.* DNAs encoding analog GM-CSF molecules displaying resistance to proteases which cleave at adjacent dibasic residues. United States Patent 5,391,485
- [ 11 ] Lin LFH, Ames LG, Sommert A *et al.* Isolation and characterization of ciliary neurotrophic factor from rabbit sciatic nerves. *J Biol Chem*, 1990, **265**(15): 8942 – 8947
- [ 12 ] Jordan GL, Harcum SW. Characterization of up-regulated protease in an industrial recombinant *Escherichia coli* fermentation. *J Ind Microb Biotech*, 2002, **28**: 74 – 80
- [ 13 ] Rockwell NC, Krysan DJ, Komiyama T *et al.* Precursor processing by Kex2/Furin proteases. *Chem Rev* 2002, **102**: 4525 – 4548

## Construction of Protease Resistant Mutein of Human CNTF and Its Expression in *Pichia pastoris*

ZHAO Hong-Liang XUE Chong XIONG Xiang-Hua ZHANG Wei ZHU Hou-Chu LIU Zhi-Min\*

(Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

**Abstract** AX15 is a mutein of naturally occurring human ciliary neurotrophic factor(hCNTF), with improved biological activity, stability and solubility. AX15 is susceptible to protease degradation when expressed in *Pichia pastoris*. Amino acid sequencing revealed the degradation was occurred behind position 12 and 13 amino acid residues, which constitute a dibasic site, RR. Based on the substrate specificity of KEX2, a KEX2 resistant mutein of AX15-AX15(R13K) was constructed, in which RR was replaced by RK. It was demonstrated that the stability of AX15(R13K) improved significantly, as no degradation was detected even after 120 hours of induction. AX15(R13K) was purified to homogeneity by ultrafiltration and gel filtration. TF-1 cell survival bioassay showed AX15(R13K) had equivalent specific activity to AX15. The protease resistant mutein of AX15 may have greater *in vivo* stability and thus have superior therapeutic potential.

**Key words** ciliary neurotrophic factor, *Pichia pastoris*, protease resistant

Received: 10-15-2003

\* Corresponding author. Tel: 86-10-66948823; E-mail: hlzhao@vip.sina.cn © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>