



## 研究报告

破坏细胞壁蛋白 *CWP2* 基因提高重组酿酒酵母  $\beta$ -葡萄糖苷酶胞外酶活

李洁 曾钰 张明明 白凤武 赵心清\*

微生物代谢国家重点实验室 上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240

**摘要:**【背景】重组酿酒酵母广泛应用于生产工业酶和药用蛋白,但是目前仍旧存在异源蛋白产量低、分泌效率差的问题,限制了生产应用。【目的】提高重组酿酒酵母异源分泌蛋白的能力,构建高效的异源蛋白生产细胞工厂。【方法】采用基于 CRISPR/Cas9 的基因组编辑技术,以生产  $\beta$ -葡萄糖苷酶的重组酿酒酵母 Y294-BGL 为出发菌株,构建细胞壁蛋白基因 *CWP2* 破坏菌株。【结果】与出发菌株相比,破坏 *CWP2* 的破坏菌株在发酵 96 h 时胞外  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活可提高 53%,胞内酶活提高了 208%。此外,破坏菌生长未受到影响,对弱酸等环境胁迫的耐性没有下降,未造成过多内质网胁迫。进一步检测发现,破坏菌株胞内活性氧水平下降,同时蛋白胞内运输和分泌途径相关的关键基因表达转录及多个细胞壁生物合成相关基因表达下降。【结论】破坏细胞壁蛋白基因 *CWP2* 能够提高异源蛋白  $\beta$ -葡萄糖苷酶的胞外酶活,可作为促进酿酒酵母生产异源蛋白的靶点基因。

**关键词:** 纤维素酶, 酿酒酵母,  $\beta$ -葡萄糖苷酶, *CWP2*, 异源蛋白表达

Disrupting cell wall protein encoding gene *CWP2* enhances extracellular  $\beta$ -glucosidase activity by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

LI Jie ZENG Yu ZHANG Ming-Ming BAI Feng-Wu ZHAO Xin-Qing\*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** [Background] *Saccharomyces cerevisiae* is widely used to produce industrial enzymes and pharmaceutical proteins. However, low protein production level and poor secretion efficiency are the major bottlenecks for its industrial applications. [Objective] To improve protein production by the recombinant yeast strains, and provide basis for development of robust yeast cell factory for heterologous protein secretion. [Methods] The cell wall protein encoding gene *CWP2* was disrupted through CRISPR/Cas9-based genome editing in the recombinant strain *S. cerevisiae* Y294-BGL, which can secrete  $\beta$ -glucosidase. [Results] At 96 h of fermentation, the extracellular activity of  $\beta$ -glucosidase in the mutant *Bcwp2* $\Delta$  was improved by 53%, and intracellular activity was improved by 208%. No negative effect on cell growth was observed, and no significant change was observed in the tolerance to acetic acid and ethanol in the mutant yeast strain *Bcwp2* $\Delta$ . In addition, no difference in growth of the mutant in the

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31461143029, 51561145014)

\*Corresponding author: Tel: 86-21-34206673; E-mail: xqzhao@sjtu.edu.cn

Received: 15-07-2019; Accepted: 26-08-2019; Published online: 28-11-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31461143029, 51561145014)

\*通信作者: Tel: 021-34206673; E-mail: xqzhao@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2019-07-15; 接受日期: 2019-08-26; 网络首发日期: 2019-11-28

presence of the endoplasmic reticulum stress inducers dithiothreitol and tunicamycin was observed. Further studies showed that less reactive oxygen species was accumulated inside the cells of the mutant. Disruption of *CWP2* decreased transcription of genes associated with protein trafficking and secretion, as well as cell wall biosynthesis genes. **[Conclusion]** Disruption of the cell wall protein encoding gene *CWP2* promotes extracellular  $\beta$ -glucosidase activity, and can be employed as a target in metabolic engineering of yeast protein production.

**Keywords:** Cellulase, *Saccharomyces cerevisiae*,  $\beta$ -Glucosidase, *CWP2*, Heterologous protein expression

酿酒酵母是具有巨大应用价值和潜力的微生物细胞工厂,利用酿酒酵母生产异源蛋白,包括工业酶和抗体等药物蛋白,一直受到广泛关注<sup>[1-2]</sup>。与细菌宿主系统相比,酿酒酵母不仅能够对异源蛋白质进行翻译后修饰,而且能够将蛋白分泌到胞外。另外,酿酒酵母对低 pH、高浓度的糖、乙醇以及高渗透压等胁迫环境耐受性更强,更适宜工业生产。但是,重组酿酒酵母异源蛋白质的产量和分泌量比较低,限制了生产应用<sup>[3-4]</sup>。研究酿酒酵母异源蛋白生产和分泌的调控机制,发现关键基因进行代谢工程改造,是促进其生产医药蛋白和工业酶应用的重要研究内容。

目前,很多研究者将目光聚焦于酿酒酵母异源蛋白分泌途径及相关代谢反应的基因工程改造。例如,操作翻译后修饰、折叠加工、蛋白分选及转运等基因可促进外源蛋白分泌<sup>[5-7]</sup>。利用酿酒酵母表达异源纤维素酶,也是酿酒酵母菌株改造的热点研究方向。纤维素酶主要包括内切葡聚糖酶(endoglucanase, EG)、外切纤维素酶(cellobiohydrolase, CBH)和  $\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -glucosidase, BGL),利用其分解纤维素类物质高效生产乙醇,一直是可再生燃料经济生产中的一个关键问题。为了提高底物和原料的利用率,通过联合生物加工(consolidated bioprocessing, CBP)过程将物料糖化和发酵过程结合,降低成本,提高一体化程度<sup>[8]</sup>。但是,目前 CBP 菌株纤维素酶分泌和展示效率都有待提高,限制了其工业应用。本课题组和南非合作者在前期研究中发现,过表达逆境胁迫耐性基因 *YHB1* 或 *SET5* 能够促进重组酵母纤维素酶的生产,表明提高应激耐受性也是提高异

源蛋白产量的一种重要手段<sup>[9]</sup>。异源蛋白质生产分泌涉及到细胞内多个生理生化反应,还有很多未知基因可能起到关键作用,例如瑞典研究者通过高通量筛选方法发现,敲除与蛋白转运相关的基因 *GOS1*、*VPS5*、*TDA3* 或脱乙酰酶复合体亚基编码基因 *HDA2* 后,能够提高  $\alpha$ -淀粉酶的分泌水平<sup>[10]</sup>。因此,酿酒酵母异源蛋白生产的工程改造不仅需要关键代谢途径和调节途径,还需要全局考虑平衡相关反应过程。目前比较重要的研究方向是找到新的关键基因,丰富蛋白转运控制体系,从而达到提高蛋白合成和分泌的目的。但是,相关研究在国内的报道还非常有限。

细胞壁作为分泌途径中最后一道屏障,对分泌效率的影响十分重要。细胞壁主要成分包括葡聚糖、几丁质和蛋白质。细胞壁的成分比例和空间结构变化都会影响其完整性。本课题组前期研究表明,参与细胞壁生成的 *UTH1* 破坏后,能够明显提高异源表达的  $\beta$ -葡萄糖苷酶分泌水平<sup>[11]</sup>。我们推测,其他细胞壁蛋白也可能对外源蛋白表达和分泌起作用。*CWP2* 编码细胞壁甘露糖蛋白,是细胞壁的主要成分,可以影响胞内质子流和 pH 稳定,也是常用的细胞壁糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidyli-nositol, GPI)锚定靶标<sup>[12-14]</sup>。已知该基因参与维持细胞壁稳定,敲除突变体可以增强细胞壁透性<sup>[15]</sup>。但是,目前利用该蛋白研究酿酒酵母异源生产纤维素酶还未见报道。本研究主要探究了细胞壁蛋白破坏菌株 *Bcwp2*  $\Delta$  对  $\beta$ -葡萄糖苷酶分泌的影响,并分析了其分泌提高的分子机理,为深入理解酿酒酵母重组蛋白的分泌表达机制提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

快速银染试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;酵母 RNA 提取试剂盒, Magen 公司;质粒小量制备试剂盒(离心柱型),上海捷瑞生物工程公司。电泳仪, Bio-Rad 公司;高通量组织研磨器,宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 质粒、菌种及培养方法

研究中涉及到的菌种及质粒信息如表 1 所示, Y294-BGL1 菌株为表达 *Saccharomycopsis fibuligera* 来源的 BGL1 的 *S. cerevisiae* Y294 菌株,由南非西开普敦大学 Riaan den Haan 博士提供,是本研究的出发菌株。Y294-Bcwp2 $\Delta$ 菌株是在出发菌株的基础上破坏基因 CWP2 得到的转化子。大肠杆菌使用 LB 培养基培养,成分包括(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0,氯化钠 10.0,固体培养基在此基础上添加琼脂粉,终浓度为 20 g/L。酿酒酵母活化与发酵均采用 YPD 培养基(g/L):葡萄糖 20.0,蛋白胨 20.0,酵母粉 10.0,固体培养基在此基础上添加琼脂粉 20.0。以上培养基均在  $1\times 10^5$  Pa 高压蒸汽灭菌 15 min。

菌株保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,取出后在 YPD 培养基中  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养约 18–24 h,转接至新鲜的 YPD 培养基中进行二次活化,待细胞生长至对数期,常温条件下 8 000 r/min 离心 2 min 收集细胞,在含有 100 mL YPD 培养基的 250 mL 锥形瓶

中进行摇瓶培养,发酵条件为  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min,初始接种量为  $OD_{600}$  为 1.0。

1.3 菌株构建

利用基于 CRISPR/Cas9 的基因组编辑技术构建 CWP2 基因破坏的菌株。首先在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  中构建 gRNA 质粒。采用两次醋酸锂转化法<sup>[17]</sup>分别将 Cas9 质粒和 gRNA 质粒导入出发菌株 Y294-BGL 中,通过 100 mg/L G418 和 300 mg/L 潮霉素 B 筛选转化子。通过验证引物 CWP2-C-F/R 扩增转化元件,测序验证正确转化子,命名为 Y294-Bcwp2 $\Delta$ 。引物信息见表 2,具体方法参照文献[18]。

1.4 菌株酶活评价

在摇瓶发酵过程中,在 24、48、72、96 h 四个时间点取发酵液 1 mL,8 000 r/min 离心 2 min,上清液为胞外蛋白溶液,沉淀经细胞破碎法得胞内蛋白溶液,分别测定胞内和胞外 BGL 酶活,将每分钟水解底物产生 1  $\mu\text{g}$  pNP (4-nitrophenol)所需的酶量定义为一个单位酶活力,具体方法参见文献[11]。

1.5 SDS-PAGE 分析

分别取出发菌株和破坏子 Y294-Bcwp2 $\Delta$ 发酵 96 h 发酵液,进行蛋白变性处理,采用 5%浓缩胶和 8%分离胶进行 SDS-PAGE 蛋白电泳,上样 22.5  $\mu\text{L}$ ,恒压操作,结束后对电泳胶使用快速银染试剂盒染色,拍照记录。染色之后采用 AlphaVIEW SA 软件进行灰度分析。

表 1 本文使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strains and plasmids	描述 Description	参考文献或来源 References or sources
Strains		
Y294-BGL1	<i>bla ura3/URA3 PGK1P-XYNSEC-S.f.cel3A-PGK1T</i>	[15]
Y294-Bcwp2 $\Delta$	<i>bla ura3/URA3 PGK1P-XYNSEC-S.f.cel3A-PGK1T, CWP2<math>\Delta</math></i>	This study
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	For plasmid construction and amplification	Lab preservation
Plasmids		
Cas9-NAT	Nourseothrycin, expression of Cas9	[16]
pRS42H-gRNA_CWP2	gRNA expression plasmid targeting CWP2 gene	This study

表 2 构建和验证菌株所使用的引物  
Table 2 Primers used for strain construction and verification

引物名称 Primers name	序列 Sequences (5'→3')
CWP2-gRNA-F	GATCAGCAGTGGTGGTAGCTTCGG
CWP2-gRNA-R	AAACCCGAAGCTACCACCACTGCT
CWP2-donor-F	TACTTAAACTGCTTAAACCGAAGCTACCACCACTGCTGCCCCATCTTCCACCGTTGAA
CWP2-donor-R	TTCAACGGTGGAAGATGGGGCAGCAGTGGTGGTAGCTTCGGTTTAAAGCAGTTTAAGTA
CWP2-C-F	CATCACATTCGCTACACACTAAC
CWP2-C-F	CAGCAAACCTCGAAGAAACCC

注：下划线的碱基为引入的终止密码子(TAA)位置。  
Note: Position of the introduced stop codon (TAA) is marked by underlined bold characters.

1.6 胞内活性氧检测

在摇瓶发酵 48、72 和 96 h 时，分别取出发菌株和破坏子发酵液 200 μL，采用 5 mg/L 荧光染料 DCFH-DA (2,7-dichlorodi-hydrofluorescein diacetate，用开水乙醇配制)处理，激发光和检测荧光的波长分别为 488 nm 和 525 nm。测得数据分别以生物量  $OD_{600}$  进行归一化处理，破坏子数据对出发菌株进行相对化处理分析，具体方法参见文献[11]。

1.7 RNA 提取及实时定量(RT-qPCR)分析

摇瓶发酵 48 h 时取 4 mL 发酵液，8 000 r/min 离心 2 min 收集菌体，用于提取 RNA 进行实时定量实验，具体方法参见文献[11]，数据处理时以 *ALG9* 作为内参基因，通过  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算基因相对表达量<sup>[19]</sup>。实验中涉及的实时定量引物见表 3。

1.8 菌株耐性评价

将培养至对数期的菌株发酵液  $OD_{600}$  调为 1.0，间隔  $10^{-1}$  分别稀释 6 个梯度，分别取 2 μL 点样于衣霉素(tunicamycin, TM)、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、荧光染色剂(calcofluor white, CFW)、乙酸和乙醇的 YPD 平板，将平板倒置放于 30 °C 恒温培养箱培养，待菌株生长充分之后拍照记录。

1.9 数据分析

所有实验结果均至少进行 3 次生物学重复，取其平均值。通过单因素方差分析法比较数据间的差异是否显著(\*:  $P<0.05$ ，显著；\*\*:  $P<0.01$ ，比较显著；\*\*\*:  $P<0.001$ ，非常显著)。

2 结果与分析

2.1 菌株生长情况及酶活评价

转化子和出发菌株 Y294-BGL 生长和酶活检测结果如图 1 所示。破坏子与对照菌株相比，生长没有受到明显抑制(图 1A)。破坏菌株胞外和胞内  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活均得到提高(图 1B 和 1C)，在发酵 96 h 时转化子 *Bcwp2*  $\Delta$  胞外酶活提高约 53%，同时测定其胞内 BGL 酶活提高了 208%。在酿酒酵母中，异源蛋白的表达经常会伴随过度糖基化修饰，可能会改变靶蛋白的结构，进而对蛋白活性造成影响。文献[20]中报道，*MNN10* 和 *MNN11* 是关键甘露糖转移酶基因，在破坏子中能够提高重组蛋白生产水平，表明甘露糖糖基化能够影响异源蛋白活性。本研究使用 Endo H 去糖基化酶处理发酵 72 h 和 96 h 酶液，然后进行 BGL 酶活测定，结果如图 1D 所示，能够看到在发酵后期酶活水平均有明显提高，但是与没有经过处理的对照组的酶活差异相比，*CWP2* 破坏引起的酶活差异在去除糖基化后提高幅度不大，表明 *CWP2* 的作用机理和酶蛋白的糖基化无关。

对发酵 96 h 的上清液也进行 SDS-PAGE 分析，结果如图 2 所示，与对照菌株相比，破坏子 *Bcwp2*  $\Delta$  的 97.9 kD 位置处条带加深， $\beta$ -葡萄糖苷酶分泌量明显增强，灰度结果分析显示胞外 BGL 含量提高约 60%，这与以上酶活测定结果相一致。综合以上结果，破坏 *CWP2* 能够显著提

表 3 本文所采用的实时定量引物

Table 3 RT-qPCR primers used in this study

基因 Genes	引物名称 Primers name	序列 Sequences (5'→3')
<i>ALG9</i>	rt-ALG9-F	ATCGTGAAATTGCAGGCAGCTTGG
	rt-ALG9-R	CATGGCAACGGCAGAAGGCAATAA
<i>BGL1</i>	rt-BGL1-F	ACCGGTTGGCAATTAGATCC
	rt-BGL1-R	AGCAAGACCGGATGGATAGC
<i>CHS3</i>	rt-CHS3-F	GCCTGCTACTTCCGTTGGACTG
	rt-CHS3-R	AGGTTGAAGCACGCTTGTGTCC
<i>RHO1</i>	rt-RHO1-F	TGGTGATGGTGCCTGTGGTA
	rt-RHO1-R	ACACGACGCCCATCAACTTC
<i>EXG2</i>	rt-EXG2-F	GGCACCACAGAGAAGGAAGAATCG
	rt-EXG2-R	CTGTTACTAGCCAGCCGCCAATAG
<i>YPS6</i>	rt-YPS6-F	CGCATTGGCATTGAACAGAACACC
	rt-YPS6-R	CCGAAGTGTGCATCAGGTCCATTC
<i>SSO1</i>	rt-SSO1-F	GGCACTCCCTGGACAACCTTC
	rt-SSO1-R	CCTGAGCTTGCTTGTGGTG
<i>SSO2</i>	rt-SSO2-F	CGAAGACGCTCAGCAAGATG
	rt-SSO2-R	CAACCACAACGACAACAACAATAG
<i>VPS36</i>	rt-VPS36-F	GGATGAATCAACCGTGAATGAACC
	rt-VPS36-R	AACTCGGACAACGTGAACTCG
<i>CCW12</i>	rt-CCW12-F	CGCTTCTGCCGCTGCTAACG
	rt-CCW12-R	TCATCGACGGTGACGGTAGCG
<i>SCW4</i>	rt-SCW4-F	ACGGTGTTGCTGTTCCATCTAAGG
	rt-SCW4-R	TTCCAGTAGTCGTTGAAGGCAGTG
<i>SCW1</i>	rt-SCW1-F	AAGCCCTCCTCCCTTGACACC
	rt-SCW1-R	GGGTAGAAGCAGGGATGCGTTG
<i>CWP1</i>	rt-CWP1-F	CTGAGAGCGATGCTGCCACTG
	rt-CWP1-R	CGGTAGCGTCGTCGGATTGC
<i>VPS1</i>	rt-VPS1-F	GGTTCTCAAGCAATGGTTATGGTG
	rt-VPS1-R	CGCCTTACTAGACGATGGTTGG
<i>SEC18</i>	rt-SEC18-F	TAGAACTCCAACGACATTCC
	rt-SEC18-R	CGTGCTTACCGCCTTACC

高胞外和胞内酶活,从而增强了重组酵母的 BGL 生产能力。

2.2 内质网胁迫应答表征

蛋白的生产和分泌是一个极其复杂的生物过程,异源蛋白的表达对宿主本身会产生一定的代谢

负担。内质网作为关键的蛋白修饰原件,其功能包括蛋白质的折加工、二硫键的形成、糖基化、羟基化等,减轻内质网胁迫是一种提高异源蛋白分泌的有效方法。还原剂二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)能破坏蛋白折叠过程中二硫键形成所需要的

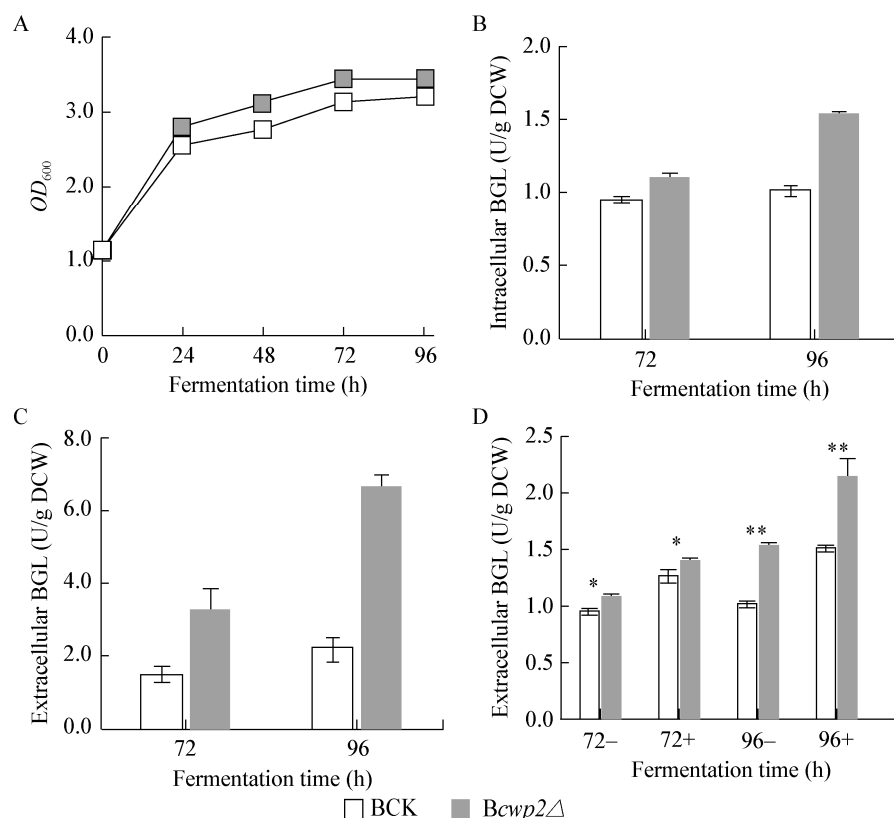


图 1 *CWP2* 破坏对菌株生长及酶活的影响

Figure 1 Effect of *CWP2* disruption on enzyme activity of  $\beta$ -glucosidase

注: A: BGL 表达菌株细胞生长情况; B: 胞外 BGL 酶活; C: 胞内 BGL 酶活; D: 糖苷酶 Endo H 处理后胞外 BGL 酶活; +: 添加 Endo H; -: 不添加 Endo H 的对照.

Note: A: Growth curve for the recombinant and control strains; B: Extracellular enzyme activities of the recombinant yeast and the control strains; C: The intracellular protein concentration of the mutant and the control strains; D: Extracellular enzyme activities after treated with glycosidase Endo H; + and - represent with and without Endo H treatment, respectively. All values represent mean values of assays done with error bars indicating standard deviations.

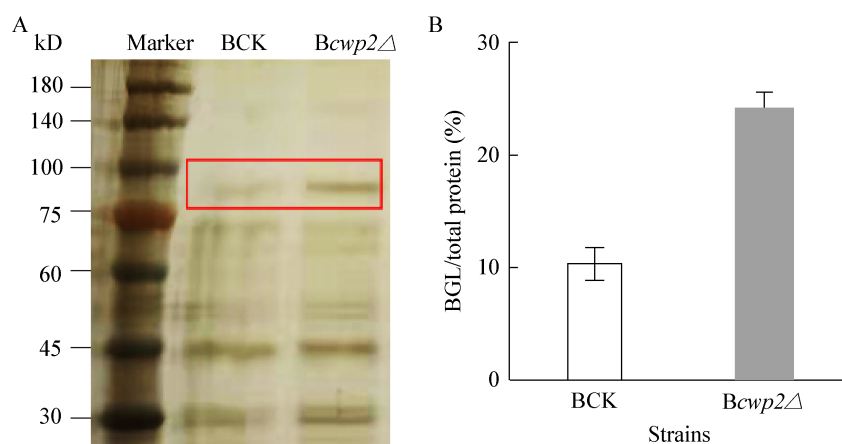


图 2 破坏菌株和对照菌株胞外上清液 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of parental strains and *CWP2* disruption strains

注: A: 蛋白电泳结果; B: 胞外 BGL 占总蛋白含量的胶图灰度分析结果.

Note: A: SDS-PAGE results of supernatant of the mutant and the control strains; B: Grayscale analysis results of the ratio of BGL in the total extracellular protein.

氧化条件。衣霉素(TM)能特异阻断内质网中蛋白折叠过程中的 N-糖基化,未正确糖基化的糖基蛋白不能被分子伴侣识别,无法正确折叠,造成内质网中错误折叠蛋白的积累。分别将菌株涂布于 5 mmol/L DTT 和 0.5  $\mu$ g/mL TM 平板上,结果如图 3 所示,添加两种诱导剂后,破坏子 *Bcwp2* $\Delta$ 和对照菌株生产情况基本一致,表明破坏 *CWP2* 基因之后,异源表达 BGL 没有增强内质网胁迫。

### 2.3 菌株耐性评价

真实发酵体系常常是十分复杂的,通过底盘酿酒酵母细胞构建一个强健的菌株,减轻外界环境对于胞内代谢过程的影响也是十分重要的。因此,对出发菌株 BCK 和破坏子 *Bcwp2* $\Delta$ 进行耐性平板生长检测实验,模拟胁迫条件分别为 3.5 g/L 乙酸、8%乙醇和 2 g/L 荧光染色剂(CFW)。如图 4 所示,培养 24 h 后重组菌株生长与对照菌基本无差别,说明破坏 *CWP2* 可以在不降低菌株耐性的情况下提高异源蛋白的分泌效率。

### 2.4 *CWP2* 破坏对重组酵母胞内活性氧的影响

酿酒酵母对体内代谢副产物活性氧(reactive oxygen species, ROS)的应激响应取决于其含量,低浓度的活性氧能够帮助细胞适应生存环境,但是大剂量的 ROS 产生会对细胞自身造成损伤,甚至使其凋亡<sup>[21]</sup>。然而,重组酿酒酵母菌株能够显著提高异源蛋白的生产,可能会造成一定的代谢负担,从而大量形成 ROS。因此,破坏子 *Bcwp2* $\Delta$ 菌株中的活性氧含量如图 5 所示,随着发酵时间延长,虽然异源蛋白产量提高,但是破坏子中活性氧水平仍旧低于出发菌株,推测破坏 *CWP2* 基因缓解了胞内的 ROS 胁迫,从而促进了  $\beta$ -葡萄糖苷酶的生产。

### 2.5 关键基因转录水平分析

为探究破坏 *CWP2* 提高重组酵母胞外 BGL 酶活的分子生物学机制,对分泌相关的关键基因进行了实时定量分析,结果见图 6。与出发菌株比较,*CWP2* 破坏子中靶蛋白  $\beta$ -葡萄糖苷酶编码基因 *BGL1* 在 48 h 时转录略有下调,表明破坏 *CWP2*

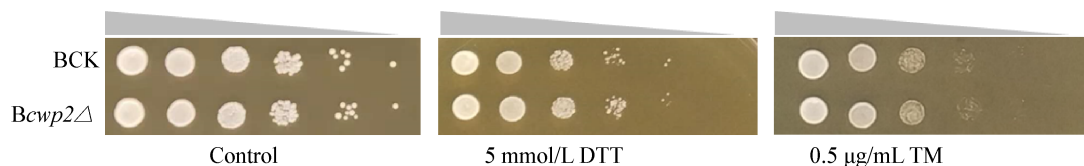


图 3 *CWP2* 破坏菌株和对照菌株内质网胁迫比较

Figure 3 The growth of *Bcwp2* $\Delta$  and the control strain under the ER stress induced by DTT or TM

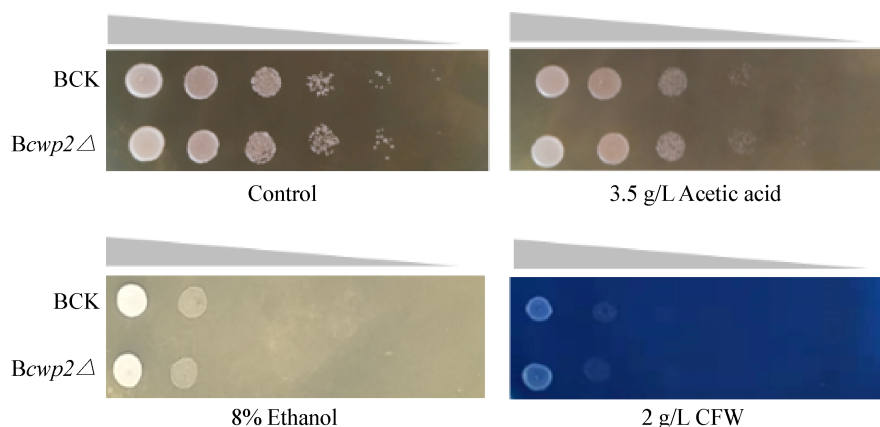


图 4 *CWP2* 破坏菌株和对照菌株耐性评价

Figure 4 Effect of *CWP2* disruption on various environmental stresses tolerance of the yeast strains

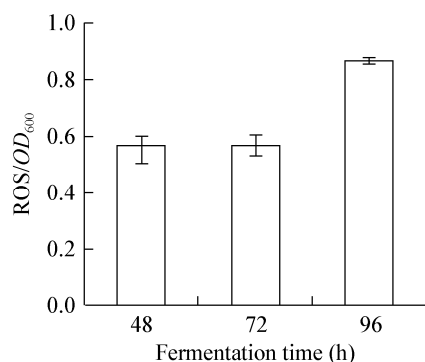


图5 *CWP2* 破坏菌株和对照菌株胞内活性氧水平比较  
Figure 5 Intracellular ROS level of the mutant and the control strains

并没有增强外源酶基因的转录水平。*SEC18* 参与内质网到高尔基体之间的蛋白质转运,表达水平变化不明显。*SSO1* 和 *SSO2* 编码高尔基体到细胞膜转运的相关蛋白,在发酵 48 h 时, *SSO1*、*SSO2* 表达下调约 66%,表明在破坏子中并没有促进囊泡受体融合,表达异源蛋白未引起细胞内质网胁迫或者通过其他途径缓解了胁迫效应。*HSP104*、*VPS1* 和 *VPS36* 参与蛋白分选过程,表达量略有下调,错误折叠蛋白质的分选和降解没有明显增强。*SCW1*、*RHO1* 和 *YPS6* 参与细胞壁的生物合成和维持, *CWP1*、*SCW4* 和 *CCW12* 均为细胞壁的蛋白质成分, *CHS3* 和 *EXG3* 分别编码几丁质合酶和葡聚糖酶。以上这 8 个基因是细胞壁的组成成分,参与维持细胞壁完整性,在破坏子中下调明显。

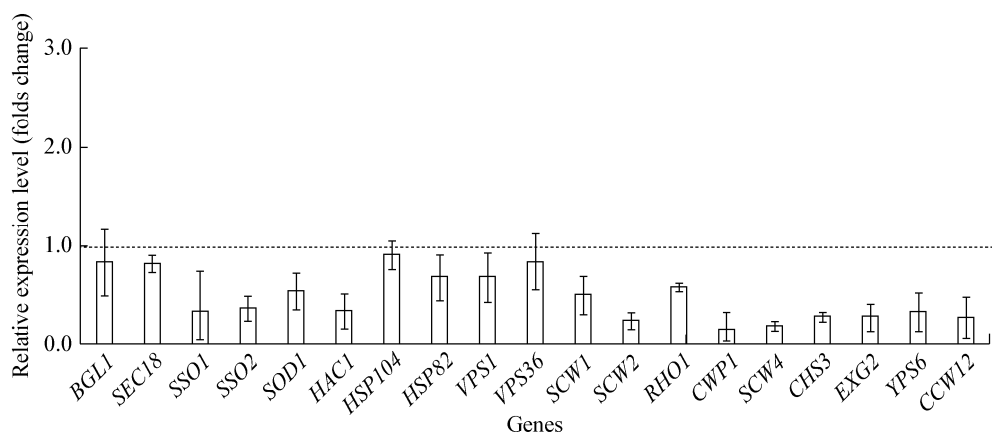


图6 *CWP2* 破坏对重组酿酒酵母关键基因转录水平的影响  
Figure 6 Effect of *CWP2* disruption on transcription levels of key genes in the recombinant strains

### 3 讨论与结论

本文发现,细胞壁蛋白 *Cwp2p* 编码基因破坏后能够促进重组酵母分泌  $\beta$ -葡萄糖苷酶,对胞内酶活提高也有重要的影响。本课题组前期研究也发现,与细胞壁功能维持相关的未知功能蛋白 *Uth1p* 编码基因破坏后,也可促进纤维素酶生产<sup>[11]</sup>。这两个研究报道都表明,细胞壁合成和结构相关蛋白功能与重组蛋白的分泌密切相关,提示其他细胞壁蛋白基因也可用于酿酒酵母蛋白分泌的代谢工程改造。

前期其他研究者发现,敲除 N 端糖基化转移酶基因 *MNN9*、*OCH1* 会降低酵母细胞壁完整性,同时破坏子胞外  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活、内切葡聚糖酶和纤维二糖水解酶都有不同程度的提高。但是,这些基因破坏会对细胞生长造成影响,最高生长速率下降约 48%<sup>[22]</sup>。本文发现破坏子 *Bcwp2*  $\Delta$  生长情况与出发菌株基本一致,外源酶蛋白基因 *BGL1* 转录水平没有提高,破坏 *CWP2* 后重组酵母对乙酸等环境胁迫条件耐性也没有变化,表明破坏子中没有改变细胞生长的代谢流,异源蛋白质产量提高可能是其他代谢过程转化而来。但是,目前该基因对异源蛋白生产以及胞内其他生化反应过程的具体影响还有待进一步研究。

CWP2 基因作为主要的细胞壁成分, 在基因工程改造中经常作为锚定蛋白进行异源蛋白展示<sup>[23]</sup>。早期研究报道利用 CWP2 等基因的 cDNA 过表达文库筛选突变体, 发现 CWP2 过表达能够提高单链 T 细胞受体的表面展示效率, 改变最佳分泌温度<sup>[24]</sup>。然而, 本文的研究发现, CWP2 破坏提高了  $\beta$ -葡萄糖苷酶分泌效率。推测不同的结果可能与异源蛋白的表达方式、异源蛋白的性质, 以及不同宿主有关。但是, 本文和前期研究都证明, 靶基因 CWP2 是酿酒酵母调控异源蛋白表达的重要操作元件。对不同蛋白不同宿主的进一步研究, 有望发现 CWP2 的表达水平如何影响不同蛋白的表达, 以及宿主遗传背景中关键的影响基因。

异源蛋白生产会影响细胞的代谢活动, 造成一定的代谢负担, 从而引起胞内的氧化损伤和 ROS 积累。ROS 是氧化蛋白折叠的产物, 内质网中蛋白质的二硫键形成、错误蛋白折叠积累都会使得 ROS 形成<sup>[25]</sup>。前期研究发现, 通过过表达超氧化物歧化酶基因 *SOD1* 能够特异性提高 Cel7B 分泌, 印证了缓解 ROS 胁迫对异源蛋白表达的促进作用<sup>[18,26]</sup>。本文中破坏靶基因 CWP2 编码的细胞壁蛋白, 胞内 ROS 水平降低, 推测可能通过细胞壁信号转导途径传递胁迫信号, 引发胞内响应机制, 保证了异源蛋白的高效表达。值得指出的是, 本课题组近期报道, 破坏 *UTH1* 基因也可提高胞外  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 但是破坏子 ROS 积累高于对照<sup>[11]</sup>, 与本文揭示的机制不同, 可见异源蛋白生产存在复杂的调控机制, 不同关键基因可能通过不同的机制影响同一个异源蛋白的合成和分泌。

异源蛋白生产包括多个过程, 包括靶蛋白基因转录和翻译, 内质网折叠修饰, 高尔基体成熟, 通过囊泡运输, 以及最后经由细胞壁分泌到胞外。此外, 近年来发现许多新的靶点基因也对重组蛋白的生产和分泌具有重要影响。本课题组前期研究发现, 过表达线粒体核糖体蛋白 Mrp8p 能提高靶蛋白的转录水平, 促进蛋白质合成<sup>[27]</sup>; 过表达组蛋白折叠蛋白 Mhflp 能促进 *SEC22* 与 *ERV29* 等基因

表达, 提高转运效率<sup>[18]</sup>; 破坏 *UTH1* 基因导致细胞壁完整性降低, 分泌途径关键基因表达也发生变化<sup>[11]</sup>。虽然 CWP2 破坏子 CFW 耐性没有变化, 与 *UTH1* 基因破坏结果不同, 但是破坏 CWP2 后细胞壁相关基因转录下调明显, 可能影响了细胞壁的组成和空间结构, 从而增强了异源蛋白的分泌效率。由于酿酒酵母外源蛋白生产比较复杂, 更多关键基因的动态变化和调控机理还有待进一步研究。

综上所述, 本研究结果表明, 破坏细胞壁蛋白 CWP2 基因可以在不影响生长的情况下显著提高异源蛋白的生产, 并且降低胞内 ROS 积累。同时, 破坏子细胞壁合成相关基因表达受到明显影响。本文的研究结果为提高酿酒酵母异源蛋白产量提供了靶点, 同时也有助于进一步理解在酿酒酵母中表达异源蛋白的调控机理。

## REFERENCES

- [1] Hou J, Tyo KEJ, Liu ZH, et al. Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Yeast Research, 2012, 12(5): 491-510
- [2] Idris A, Tohda H, Kumagai H, et al. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(2): 403-417
- [3] Nielsen J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering[J]. Bioengineered, 2013, 4(4): 207-211
- [4] Kroukamp H, den Haan R, van Zyl JH, et al. Rational strain engineering interventions to enhance cellulase secretion by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2018, 12(1): 108-124
- [5] Tokunaga M, Kato S, Kawamura-Watabe A, et al. Characterization of deletion mutations in the carboxy-terminal peptide-binding domain of the Kar2 protein in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Yeast, 1998, 14(14): 1285-1295
- [6] Kim MD, Park EH, Cho JW, et al. Enhanced production of antithrombotic hirudin by coexpression of Pdi1 and Ero1 in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biotechnology, 2007, 131(S2): S147
- [7] Liu ZH, Tyo KEJ, Martínez JL, et al. Different expression systems for production of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2012, 109(5): 1259-1268
- [8] Yang PZ, Zhang HF, Jiang ST. Construction of recombinant *sest* *Saccharomyces cerevisiae* for consolidated bioprocessing, cellulase characterization, and ethanol

- production by in situ fermentation[J]. 3 Biotech, 2016, 6(2): 192
- [9] Lamour J, Wan C, Zhang MM, et al. Overexpression of endogenous stress-tolerance related genes in *Saccharomyces cerevisiae* improved strain robustness and production of heterologous cellobiohydrolase[J]. FEMS Yeast Research, 2019, 19(4): foz035
- [10] Huang MT, Wang GK, Qin JF, et al. Engineering the protein secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* enables improved protein production[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(47): E11025-E11032
- [11] Zeng Y, Xiong L, Li J, et al. Disruption of *UTH1* improves  $\beta$ -glucosidase secretion by the recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Mycosystema, 2018, 37(11): 1479-1488 (in Chinese)  
曾钰, 熊亮, 李洁, 等. *UTH1* 基因破坏提高重组酿酒酵母分泌  $\beta$ -葡萄糖苷酶[J]. 菌物学报, 2018, 37(11): 1479-1488
- [12] van der Vaart JM, Caro LH, Chapman JW, et al. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(11): 3104-3110
- [13] Skrzypek M, Lester RL, Spielmann P, et al. Dominant suppressor mutation bypasses the sphingolipid requirement for growth of *Saccharomyces* cells at low pH: role of the *CWP2* gene[J]. Current Genetics, 2000, 38(4): 191-201
- [14] Castillon GA, Watanabe R, Taylor M, et al. Concentration of GPI-anchored proteins upon ER exit in yeast[J]. Traffic, 2009, 10(2): 186-200
- [15] van Rooyen R, Hahn-Hägerdal B, La Grange DC, et al. Construction of cellobiose-growing and fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. Journal of Biotechnology, 2005, 120(3): 284-295
- [16] Zhang M, Liang YP, Zhang XH, et al. Deletion of yeast *CWP* genes enhances cell permeability to genotoxic agents[J]. Toxicological Sciences, 2008, 103(1): 68-76
- [17] Gietz RD, Schiestl RH. Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method[J]. Nature Protocols, 2007, 2(1): 38-41
- [18] Yu XS, Zeng Y, Li J, et al. Effects of overexpression of the MHF histone fold complex component encoding gene *MHF1* on production of cellulase by the recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiology China, 2019, 46(1): 75-83 (in Chinese)  
于欣水, 曾钰, 李洁, 等. MHF 组蛋白折叠复合体组分编码基因 *MHF1* 过表达对重组酿酒酵母纤维素酶生产的影响[J]. 微生物学通报, 2019, 46(1): 75-83
- [19] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [20] Wang TY, Huang CJ, Chen HL, et al. Systematic screening of glycosylation—and trafficking-associated gene knockouts in *Saccharomyces cerevisiae* identifies mutants with improved heterologous exocellulase activity and host secretion[J]. BMC Biotechnology, 2013, 13: 71
- [21] Pérez-Gallardo RV, Briones LS, Díaz-Pérez AL, et al. Reactive oxygen species production induced by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* increases because of a dysfunctional mitochondrial iron-sulfur cluster assembly system[J]. FEMS Yeast Research, 2013, 13(8): 804-819
- [22] Tang HT, Wang SH, Wang JJ, et al. *N*-hypermannose glycosylation disruption enhances recombinant protein production by regulating secretory pathway and cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 25654
- [23] Liu WS, Zhao HY, Jia B, et al. Surface display of active lipase in *Saccharomyces cerevisiae* using Cwp2 as an anchor protein[J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(2): 255-260
- [24] Wentz AE, Shusta EV. A novel high-throughput screen reveals yeast genes that increase secretion of heterologous proteins[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(4): 1189-1198
- [25] Gross E, Sevier CS, Heldman N, et al. Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(2): 299-304
- [26] Kroukamp H, den Haan R, van Wyk N, et al. Overexpression of native *PSE1* and *SOD1* in *Saccharomyces cerevisiae* improved heterologous cellulase secretion[J]. Applied Energy, 2013, 102: 150-156
- [27] Wan QQ, Li J, Zeng Y, et al. Enhanced production of cellobiohydrolase in the recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by *MRP8* overexpression[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(5): 94-100 (in Chinese)  
万青青, 李洁, 曾钰, 等. *MRP8* 过表达促进重组酿酒酵母外切纤维素酶生产[J]. 生物技术通报, 2018, 34(5): 94-100