

# 丝状真菌外源基因表达系统研究的现状及展望

刘 谨 王汉忠

(山东农业大学生命科学院 泰安 271018)

关键词: 丝状真菌, 基因工程, 限制步骤, 解决方案

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2000)06-0453-05

利用大肠杆菌和酵母作为宿主菌生产外源蛋白有不少已发展到工业规模,但其存在的缺陷表明它们并不总是生产外源蛋白的理想宿主。大肠杆菌大量合成的外源蛋白大多以包涵体形式存在于细胞内,且不能对真核蛋白进行糖基化等翻译后加工,所以大肠杆菌作为表达宿主很难直接得到有活性的真核蛋白;酵母合成的蛋白虽然可以分泌,但其产量普遍低,并且酵母对外源蛋白的修饰模式与高等真核生物的差别较大。

丝状真菌作为生产外源蛋白的宿主可弥补细菌和酵母的不足。首先,丝状真菌具有很强的外泌蛋白能力。其次,丝状真菌能对合成的真核蛋白较正确地进行各种翻译后加工,包括肽链的剪切和糖基化等。并且,其糖基化形式较酵母更类似于高等真核生物。再次,由于在食品及食品加工中的长期应用,许多菌种,如黑曲霉(*Aspergillus niger*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)已被公认是安全的(GRAS: Generally Regarded As Safe)。

同时,丝状真菌的发酵工艺及下游加工技术已完善建立起来,这为工程菌投入工业生产打下良好基础。

早在一个世纪之前,人们已经知道丝状真菌可以分泌大量的酶和有机酸,这带来酶和有机酸工业的发展。当今的发酵工业利用丝状真菌生产大量产品,年产值已达几十亿美元。丝状真菌大规模工业应用的同时,人们也开始对其进行基因表达调控方面的研究。分子生物学的发展已为丝状真菌生产同源、异源(尤其是哺乳动物)蛋白开辟了广阔的天地。1979年,Case *et al.*首先在粗糙链孢菌(*Neurospora crassa*)建立了DNA转化系统<sup>[1]</sup>。四年后,构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)DNA转化成功<sup>[2]</sup>。在过去十年里,黑曲霉、构巢曲霉、米曲霉、木霉被广泛用作基因工程宿主菌。其中碱性脂肪酶、牛凝乳酶等工程菌已投入应用。以黑曲霉为例,丝状真菌作为外源蛋白生产宿主的优缺点列于表1<sup>[3]</sup>。

丝状真菌具备极强的外泌蛋白能力,已有报道,曲

表1 黑曲霉作为外源蛋白生产宿主的优缺点

优点	缺点	不确定之处
天然良好的蛋白质外泌能力	非常用载体	糖基化
工业应用已久	低转化频率	基因整合的位置
重组子稳定	遗传学背景知识贫乏	
安全	蛋白酶降解	

霉、木霉在发酵过程中能分泌高达30g/L的内源蛋白, (如纤维素酶、葡糖淀粉酶)<sup>[4]</sup>。尽管丝状真菌分泌内源蛋白的能力是很振奋人心的,可是外源蛋白的产量远不如内源蛋白高。也许,在蛋白质的加工及随后的分泌路径中,外源蛋白对蛋白酶降解比内源蛋白更敏感<sup>[5]</sup>。通常外源蛋白的产量在每立升几十微克至150mg之间,但也有少数例外,如在构巢曲霉中构建的牛凝乳酶

原基因工程菌,其牛凝乳酶原的分泌量超过1g/L<sup>[6]</sup>,这是迄今为止投产的第一个食品工业用酶的基因工程菌。目前,为利用丝状真菌大量分泌蛋白的能力,人们在加强基础研究的同时积极开发使其成为生产高附加值的重组蛋白的理想宿主菌。

收稿日期: 1999-12-16, 修回日期: 2000-04-03

### 1 限制产量步骤的系统分析

**1.1 转录水平** 在丝状真菌中,许多外源基因具有极高的转录速率<sup>[7]</sup>,所以转录过程中的障碍更可能由于mRNA的不稳定。在哺乳动物、酵母细胞中,影响mRNA稳定性的因素至少可归结为五个方面①5'端7-甲基的帽子结构,②3'端 polyA 尾,③mRNA 的长度,④转录后修饰,如腺嘌呤残基甲基化、腺嘌呤与次黄嘌呤的转化,⑤mRNA 含有的稳定或不稳定序列。mRNA 的结构及组成(如含大量罕用密码子)均可导致 mRNA 的不稳定,最终使 mRNA 被降解。针对丝状真菌 mRNA 稳定性方面的系统研究未见报道,目前只是根据实验结果进行推测。比如:人体白细胞介素-6(hIL-6)和瓜尔豆 $\alpha$ -半乳糖苷酶(AGL)mRNA 水平很低,很难分清是受 mRNA 结构的影响还是密码子组成的影响。通过对照曲霉中密码子组成,发现 $\alpha$ -半乳糖苷酶含有较高量曲霉的罕用密码子。由此推测,可能是密码子组成导致了低 mRNA 水平<sup>[4]</sup>。

**1.2 翻译及翻译后水平** Michael Ward *et al.*在提高牛凝乳酶产量的实验中发现整合的质粒拷贝数与牛凝乳酶的产量并不一致,牛凝乳酶 mRNA 含量相当高,但最终的产量却并不高<sup>[8]</sup>,由此推断,影响异源蛋白分泌量的另一个因素发生在翻译及翻译后。

当曲霉中有大量罕用密码子存在时,会导致翻译

速率降低、错译、阅读框偏移。翻译速率降低,则新生蛋白向内质网的运输可能会被削弱,导致新生蛋白滞留在胞质中,最终被胞质中的蛋白酶降解;如果新生蛋白折叠不正确,就会被内质网滞留,最终被降解。

实验表明,当牛凝乳酶蛋白中引入一个糖基化位点,酶蛋白产量增加了 10 倍<sup>[9]</sup>,这说明糖基化确实是一个重要因素。人体白细胞介素-6与葡糖淀粉酶基因融合后产量增加,但人体白细胞介素-6的产量只是来源于同一融合蛋白的葡糖淀粉酶产量的 10%~20%。已知在泡盛曲霉中,人体白细胞介素-6不会在胞外被降解<sup>[10]</sup>,由此推测这可能是由于融合蛋白中的人体白细胞介素-6在高尔基体膜上被降解了,即或许是被菌丝体上结合的蛋白酶所降解。

蛋白质的分泌路径是涉及到在几个细胞器中进行的复杂过程,见表 2<sup>[4]</sup>。至今对于分泌路径的研究虽然主要限于哺乳动物和酵母,但超微电镜研究表明丝状真菌与酵母、哺乳动物的细胞并无本质的差异。Damell 等<sup>[4]</sup>发现,分泌蛋白的成熟所包括的糖基化和专一蛋白酶裂解过程发生在内质网,高尔基体和一些分泌作用的细胞器。因此,借鉴酵母与哺乳动物蛋白质的分泌路径的研究结果,通过对构建丝状真菌高分泌载体实验的探索可以分析丝状真菌的蛋白质分泌过程,已认识到外源蛋白的分泌可能在某个或某几个环节受到阻碍。

表2 蛋白质的分泌路径及可能的限制步骤

	细胞核	胞质	内质网	高尔基	后高尔基体
关键步骤	前mRNA 加工	mRNA 稳定性	翻译 信号识别 移位 折叠/修饰 糖基化	蛋白质加工 糖基化	后高尔基过程 胞壁通路
可能的 瓶颈	AU丰富 序列	mRNA 不稳定 因素	蛋白质的三级结构 折叠酶或分子伴侣短缺 蛋白酶降解	不正确加工	蛋白酶降解
可行的 解决 方法	合成不含 AU丰富 区的基因	基因 融合	基因融合 折叠酶或分子伴侣过量产生 蛋白酶缺陷株	加工酶的 过量生产	蛋白酶缺陷株

### 2 提高异源蛋白产量的对策

为了提高异源蛋白的产量,人们进行了一系列实验,效果比较显著的方法有:增加基因拷贝数、使用强

启动子、基因融合、使用蛋白酶缺陷菌株,优化培养条件。

#### 2.1 增加基因拷贝数 引入多拷贝的表达载体,一般

可以提高表达。Verdoes等在黑曲霉中进行的增加葡糖淀粉酶基因拷贝数的实验表明,酶表达量在一定范围内(1~20拷贝)与拷贝数成线性关系,但随拷贝数的进一步提高,或许由于调控蛋白的滴定效应,表达不再升高<sup>[1]</sup>。

**2.2 使用强启动子** 强启动子来源于高效表达丝状真菌基因。在构建的丝状真菌表达载体中用的最多的是曲霉葡糖淀粉酶基因(*glaA*)启动子、构巢曲霉的3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(*gpdA*)启动子,米曲霉的 $\alpha$ -淀粉酶基因(*amyB*)启动子,里氏木霉纤维二糖水解酶基因(*cbh2*)启动子。增强启动子的活性也可以提高表达。例如,将多拷贝的米曲霉淀粉酶基因启动子的保守序列区III片段引入 $\alpha$ -葡萄糖苷酶基因(*agdA*)启动子,启动子的活性在转录水平明显增强<sup>[11]</sup>。

**2.3 基因融合** 对于丝状真菌外源蛋白的生产,基因融合的应用是很成功的。有人认为,基因融合对转录及翻译(后)阶段有积极作用,如提高mRNA含量及稳定

性、提高蛋白质分泌效率,防止降解。在基因融合策略中,应用最多的是黑曲霉、泡盛曲霉的葡糖淀粉酶基因(*glaA*)。从蛋白的结构上看,葡糖淀粉酶可分为3部分:N端催化区、C端结合区、及位于两者之间的间隔区。C端结合区可被异源蛋白有效取代,即在融合基因中往往使用截短的*glaA*。虽然,完整的*glaA*融合相对于未融合形式已经是成功的<sup>[12]</sup>。但是当在融合基因中使用截短的*glaA*基因时,产量会继续增加。例如,在牛凝乳酶表达盒中,使用缺少编码GLA结合区(只含5'端511个氨基酸)的*glaA*-511作载体蛋白的酶产量是使用缺少最后9个氨基酸*glaA*-603的5倍<sup>[13]</sup>;此外对人体白细胞介素-6、瓜尔豆半乳糖苷酶(AGL)、鸡蛋清溶菌酶(HEWL)的研究结果也与此类似<sup>[14]</sup>。据推测,之所以截短的*glaA*基因(通常含催化区和间隔区的编码序列占全长的80%以上)效果更好,是由于截去了结合区后消除了对外源蛋白的空间障碍作用,使连接在间隔区两端的载体蛋白的催化区和外源蛋白能自由折叠,减

表3 丝状真菌利用基因融合生产外源蛋白的实例

蛋白质及宿主	启动子	"KEX"接头	蛋白质产量	文献
牛凝乳酶原				
<i>A.wamori</i>	<i>A.wamori glaA</i>	-	1g/L <sup>a,b</sup>	4
<i>A.oryzae</i>	<i>A.oryzae glaA</i>	-	150mg/kg <sup>d</sup>	4
Fab抗体片段				
<i>T.reesei</i>	<i>T.reesei cbh2</i>	+	50~150mg/L <sup>c</sup>	4
鸡蛋清溶菌酶				
<i>Aniger</i>	<i>Aniger glaA</i>	+	1g/L	4
人体白细胞介素-6				
<i>Anidulans</i>	<i>Anidulans alcA</i>	+	>100mg/L	4
人体干扰素				
<i>A.wamori</i>	<i>A.wamori glaA</i>	-	>2g/L	4
人体溶菌酶				
<i>T.geodes</i>	<i>T.reesei</i>	-	10~150mg/L	4
猪胰磷脂酶原A2				
<i>Aniger</i>	<i>Aniger glaA</i>	-	10mg/L <sup>a</sup>	4
奇异果甜蛋白				
<i>Aniger var. awamori</i>	<i>Aniger glaA</i>	+	5~7mg/L	12
植物 $\alpha$ -半乳糖苷酶				
<i>A.wamori</i>	<i>A.wamori exdA</i>	+	10~12mg/L	4,10
1,2- $\alpha$ -甘露糖苷酶				
<i>A.oryzae</i>	<i>A.oryzae amyB</i>	-	21mg/L	13

a 蛋白酶缺陷菌株, b 结合系列突变, c 深层发酵, d 固体发酵

少了折叠错误,降低了被蛋白酶降解的机率。Ward等将牛凝乳酶基因与黑曲霉 *glaA* 基因融合后转入 *A. awamori*, 分泌到菌体外的凝乳酶蛋白比单独表达凝乳酶基因时提高近20倍<sup>[8]</sup>。参照 Gouka RJ et al. 的综述<sup>[4]</sup>, 作者将收集到的丝状真菌利用基因融合生产外源蛋白的部分实例列于表3。

除 *glaA* 的长度影响外泌产量外, *glaA* 与外源基因的连接方向也起作用。在 Robin J. et al 的研究报告中提及, *glaA* 融合到 hIL-6 基因的 3' 端时, 几乎无外源蛋白产生; 而融合到 5' 端, 外源蛋白的产量可观, 尽管两种融合在 mRNA 水平上很相近<sup>[15]</sup>。

在融合基因中, 内源基因(如 *glaA*) 与外源目的基因的连接处加上丝状真菌内肽酶的识别位点便可实现外源蛋白与内源蛋白的分离, 容易地得到外源蛋白产物。曲霉含有一种与酵母 KEX-2 相似的蛋白酶, 它可以识别和剪切暴露的 Lys-Arg、Arg-Arg 和 Arg-Lys 位点。通过对哺乳动物 200 种激素前体预测的二级结构的分析, Rholam 发现 KEX-2 的裂解位点位于  $\beta$ -转角构象, 而包含在  $\alpha$ -螺旋或  $\beta$ -折叠构象中的位点未被裂解<sup>[16]</sup>。

**2.4 蛋白酶缺陷株** 丝状真菌自身分泌的蛋白酶对于异源蛋白的生产是一个极大的障碍。这些蛋白酶或位于细胞质内或胞壁上、或分泌到细胞外, 能迅速降解多种异源蛋白。为克服蛋白酶的降解, 通过诱变或分子遗传学方法, 已经分离到丝状真菌蛋白酶缺陷菌株<sup>[17]</sup>。Mattern 等用诱变处理筛选到一株酸性、中性、碱性蛋白酶几乎完全缺陷的 *A. niger*, 以此为宿主表达鸡脂肪酶, 其分泌量比在诱变前宿主菌中有大幅度提高<sup>[18]</sup>。

**2.5 优化培养条件** 工程菌的培养条件对于产品产量、质量的影响是不容忽视的。丝状真菌的培养过程分菌丝体生长阶段和蛋白质分泌阶段。在丝状真菌生长阶段, 葡萄糖的存在可使菌丝体量达最大值, 而在后一阶段为使目的蛋白高产, 则需在不含葡萄糖、有诱导物的条件下培养。已证实, 黑曲霉分泌的大量胞外蛋白酶是酸性蛋白酶, 并且受低 pH 诱导<sup>[16]</sup>。所以, 保持高 pH 可阻止蛋白酶分泌, 防止外源蛋白被降解<sup>[12]</sup>。

### 3 关于异源蛋白的质量

除了异源蛋白高表达水平外, 还必须关注其质量。要生产高质量的蛋白, 专一、高均一形式的糖基化是必要的, 因正确的糖基化对蛋白的折叠、组装、生物活性或半衰期是非常重要的。曲霉已经用于表达许多有药

用价值的蛋白, 如表皮生长因子(EGF), 人生长激素(hGH), 组织纤溶酶原激活物(tPA),  $\alpha$ -2干扰素(IFN  $\alpha$ -2), 粒细胞集落刺激因子(hGCSF),  $\alpha$ -1抗胰蛋白酶, 乳铁蛋白(hLF), 甲状腺腺激素(PTH), 白细胞介素-6(IL-6), 表皮类固醇结合球蛋白(CBG)等<sup>[19]</sup>。这些蛋白中的许多都含有 N-聚糖。丝状真菌的糖基化系统比酵母更类似哺乳动物, 能正确进行翻译后的修饰, 这种修饰是表达产物的生物活性必需的。但有时也存在一些问题, 主要是 N-连接的高甘露糖型的糖链不均一, 高甘露糖侧链会导致人们所不希望的副作用, 如产生免疫反应, 从而影响该药物的继续使用。曲霉缺少将 N-聚糖进一步加工成在较高等真核生物中发现的更复杂的形式的机制, 因此, 有人尝试通过基因移植, 即有选择地将较高等真核生物的糖基转移酶基因转移到曲霉中, 从而在胞内对分泌的异源蛋白进行改造<sup>[20]</sup>。

不同的启动子会对外源蛋白的糖基化产生不同的影响, 从而影响外源蛋白的活性。如组织纤溶酶原激活因子在构巢曲霉中表达, 用磷酸丙糖异构酶启动子时的糖基化形式与用中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的相同<sup>[4]</sup>; 而用组成型的黑曲霉醇脱氢酶基因(*adhA*)启动子时, 虽然表达水平较高, 但重组的 tPA 过分糖基化。用 *adhA* 启动子表达粒细胞集落刺激因子和  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶时, 也会产生过分糖基化现象<sup>[6]</sup>。

以丝状真菌为宿主菌生产外源蛋白, 已受到越来越多的关注。尤其是碱性脂肪酶、牛凝乳酶的成功投产更增加了人们对丝状真菌的信心。同时, 对丝状真菌遗传学背景知识的不断积累也为丝状真菌的应用研究提供了有利的帮助。尽管, 目前多数外源蛋白的生产还不尽如人意, 但丝状真菌的应用前景却越来越得到人们的共识, 尤其在低附加值的制药业中, 丝状真菌分泌的药用蛋白将有广阔的市场。

### 参 考 文 献

- [1] Case M E, Schweizer M, Kushner S R et al. Proc. Nabl Acad Sci, 1979, 76: 5259~5263.
- [2] Ballance D J, Buxton F P, Turner G. Biochem Biophys Res Commun, 1983, 112: 284~289.
- [3] David B A, David J J, Donald A M, Anto van leeu, 1994, 65: 245~250.
- [4] Gouka R J, Punt P J, van den Hondel CAMJJ. Appl Micro Bio, 1997, 47: 1~11.

- [5] Saunders G, Picknett T M, Tuite M F *et al.* TIBTECH, 1989, 7:283~287.
- [6] Dunn-Coleman N S, Bloebaum P, Berka R M *et al.* Bio / Technol, 1991, 9:976~981.
- [7] Mackenzie D A, Jeenes D J, Belshaw N J *et al.* J Gen Microbiol, 1993, 139:2295~2307.
- [8] Ward M, Wilson L J, Kodama K H *et al.* Bio / Technology, 1990, 8:435~440.
- [9] Berka R M, Bayliss F T, Bloebaum P *et al.* *A. niger* var *awamori* as a host for the expression of heterologous gene. In: Keffy JW, Baldwin TO ed. Application of enzyme biotechnology. New York: Plenum Press, 1991.
- [10] Gouka R J, Punt P J, Hessing J G M *et al.* Appl Environ Microbiol, 1996, 62:1951~1957.
- [11] Minetoki T, Kumagai C, Gomi k *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 50:459~467.
- [12] Faus L, Del Moral C, Adroer N *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 49:393~398.
- [13] Yoshida T, Nakajima T, Ichishima E. Biosci Biotech Biochem, 1998, 62(2):309~315.
- [14] Tsuchiya K, Nagashima T, Yamamoto Y *et al.* Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(5):895~899.
- [15] Gouka R J, Punt R J, van den Hondel C A M J J. Appl Environ Microbiol, 1997, Feb:488~497.
- [16] Rholam M, Nicolas P, Cohen P. FEBS Lett, 1986, 207:1~6.
- [17] Mattern I E, van Noort JM, Berg P *et al.* Mol Gen Genet, 1992, 234:332~336.
- [18] Van den Hondel C A M J J, Punt R J, van Gorcom R F M. Heterologous gene expression in filamentous fungi. In: Bennet J W, Lasure L L ed. More gene manipulation in fungi. San Diego: Academic Press:396~428
- [19] Hintz W E, Kalner I, Plawinski E *et al.* Can J Bot, 1995, 73(Suppl 1):S876~S884.
- [20] Upshall A, Kumar A A, Bailey M C *et al.* Bio / Technology, 1987, 5:1301~1304.