

## 研究报告



# 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

于欣水<sup>1</sup> 曾钰<sup>2</sup> 李洁<sup>2</sup> 张明明<sup>2</sup> 白凤武<sup>2</sup> 赵心清<sup>\*2</sup>

1 大连理工大学生命科学与技术学院 辽宁 大连 116024

2 上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240

**摘要:**【背景】重组酿酒酵母可用于生产多种药用蛋白和工业酶等外源蛋白,但蛋白分泌水平低是限制其异源蛋白高效生产的重要因素。异源蛋白表达和分泌过程可能会对宿主细胞产生多种胁迫,因此,研究胁迫响应相关基因对重组酵母异源蛋白生产的影响具有重要意义。Mhf1p 是 MHF 组蛋白折叠复合体的组分之一,与 DNA 损伤修复及维持基因组稳定性有关,但其对异源蛋白生产的作用尚不清楚。【目的】研究 *MHF1* 过表达对重组酿酒酵母蛋白生产的影响。【方法】在分泌表达纤维素酶的重组酿酒酵母菌株中利用基于 CRISPR-Cas9 的基因组编辑技术整合过表达 *MHF1*,分析其对产酶的影响,并探讨影响产酶的分子机理。【结果】与出发菌株相比,过表达 *MHF1* 菌株的外切纤维素酶 CBH 酶活性提高了 38%。对过表达 *MHF1* 的 CBH 生产菌株中蛋白合成和分泌途径相关基因转录水平进行检测,发现与对照菌株相比, *CBH1* 基因和与分泌相关的 *SEC22*、*ERV29* 等基因在不同时间点呈现不同程度显著上调。【结论】*MHF1* 过表达可促进酿酒酵母异源外切纤维素酶的生产,并影响外源酶基因和分泌途径基因的表达,可能通过对多基因的协同表达影响促进产酶。

**关键词:** 酿酒酵母, 异源蛋白生产, *MHF1*, 纤维素酶, 全局代谢调控

## Effects of overexpression of the MHF histone fold complex component encoding gene *MHF1* on production of cellulase by the recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

YU Xin-Shui<sup>1</sup> ZENG Yu<sup>2</sup> LI Jie<sup>2</sup> ZHANG Ming-Ming<sup>2</sup> BAI Feng-Wu<sup>2</sup> ZHAO Xin-Qing<sup>\*2</sup>

1 School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China

2 School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** [Background] *Saccharomyces cerevisiae* is widely used to produce valuable proteins such as pharmaceutical proteins and industrial enzymes, but the low protein production and secretion level are challenging for efficient production of heterologous proteins. Synthesis of heterologous proteins and their secretion may produce a variety of stresses to host cells, thereby inhibit the production efficiency.

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

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

**Received:** 16-03-2018; **Accepted:** 17-04-2018; **Published online:** 05-06-2018

**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:** 2018-03-16; **接受日期:** 2018-04-17; **网络首发日期:** 2018-06-05

Therefore, studying the effects of stress responsive genes on heterologous protein production is of great significance. Mhf1p is one of the components of MHF histone folding complex, and involved in repairing damaged DNA and maintenance of genome stability, but its role in the production of heterologous proteins remains unclear. **[Objective]** To study whether *MHF1* overexpression can promote protein production in the recombinant *S. cerevisiae*. **[Methods]** *MHF1* was overexpressed by chromosomal integration in the recombinant *S. cerevisiae* strains producing different cellulases employing CRISPR-Cas9 based genome editing, and cellulases secretion was compared with that of the control strain. Furthermore, the underlying molecular mechanisms were explored. **[Results]** Compared with that of the control strain, cellobiohydrolase (CBH) activity in the *MHF1* overexpressing strain was increased by 38%. Transcription levels of key genes such as genes related to protein production and secretion of the yeast strains were further detected. Comparing with that of the parent strain, elevated transcription levels of *CBH1*, as well as key genes related to protein secretion such as *SEC22* and *ERV29* in different time points were revealed by overexpression of *MHF1*. **[Conclusion]** Overexpression of *MHF1* promoted the production of a heterologous cellobiohydrolase in *S. cerevisiae*. Enhanced transcription of *CBH1* and genes involved in secretion pathway was revealed, indicating that *MHF1* modulates heterologous protein production by synergistic regulation of multiple genes.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, Heterologous protein production, *MHF1*, Cellulase, Global metabolic regulation

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)具有生长速度快、易于培养、可进行蛋白翻译后修饰和可将蛋白分泌到培养基等优势,其作为异源表达宿主在药用蛋白、工业酶等高附加值异源蛋白生产应用中的研究受到普遍关注<sup>[1-2]</sup>。然而,由于酿酒酵母蛋白分泌水平较低,限制了实际应用<sup>[3]</sup>。为了提高酿酒酵母异源蛋白生产水平,目前所采用的策略主要包括两大类,一是提高异源蛋白表达量,二是增强异源蛋白分泌途径。提高异源蛋白表达量可通过筛选合适来源的基因、优化异源蛋白密码子、提高基因拷贝数等方式实现<sup>[1]</sup>。异源蛋白的分泌包括蛋白的翻译后修饰、蛋白转运、内质网折叠和囊泡运输过程。对分泌途径各环节的关键基因进行过表达或敲除可以提高蛋白的分泌效率<sup>[1-2]</sup>,包括优化信号肽序列<sup>[4]</sup>、激活未折叠蛋白反应(Unfolded protein response, UPR)<sup>[5]</sup>、过表达蛋白质折叠相关的二硫键异构酶 Pdi1p 等<sup>[2]</sup>。但目前对酿酒酵母分泌生产异源蛋白的调控机制了解相对较少。

酿酒酵母异源蛋白生产导致的底物竞争会直接影响胞内的相关代谢过程,或者间接地影响其他代谢过程。因此,代谢网络的全局平衡调控可以有效提高异源蛋白的生产。例如,紫外诱变获

得的  $\alpha$ -淀粉酶高分泌菌株在全基因组转录水平的分析表明,通过改变能量代谢结构、平衡氨基酸生物合成和减弱硫胺素合成等手段可提高蛋白分泌性能<sup>[6]</sup>。异源蛋白的大量合成和折叠分泌等可能对细胞代谢造成一定负担,产生代谢胁迫。南非学者的研究表明,超氧化物歧化酶基因 *SOD1* 过表达可提高重组酿酒酵母纤维素酶的生产<sup>[7]</sup>。此外,有研究显示,与细胞胁迫相关的热激响应(Heat shock response, HSR)的激活能够提高酿酒酵母异源  $\alpha$ -淀粉酶的生产<sup>[8]</sup>。因此,研究与环境胁迫响应相关基因对蛋白分泌的影响,有利于从全局水平提高异源蛋白生产效率。但目前通过调控全局代谢网络来提高重组酵母分泌蛋白生产的研究还很少。对影响酿酒酵母蛋白生产的新基因进行挖掘,不仅有利于发现异源蛋白生产的调控机理,还有助于开发更有效的策略提高异源蛋白的分泌生产。

在酿酒酵母中, MHF 组蛋白折叠复合体组分 Mhf1p 与 FANCM 直系同源物在相同的途径中发挥作用,修复由 DNA 损伤剂甲磺酸甲酯(MMS)引起的 DNA 损伤,并在阻断的复制叉中促进基因转换,保护基因组的完整性<sup>[9]</sup>。此外,其与 Mhf2p 形成一个类似组蛋白(H3-H4)<sub>2</sub>异四聚体结构的 MHF

复合物,这种四聚体的结构在发挥生物学功能中扮演着十分重要的作用<sup>[10]</sup>。*MHF1* 编码产物维护基因组完整性表明其对细胞全局代谢具有一定调控作用,有可能对重组酵母蛋白生产也有一定影响。研究 *MHF1* 过表达对重组酵母异源蛋白生产的影响,并进一步探讨其提高产酶的分子机理,可为深入研究酿酒酵母异源蛋白表达的调控机理和提高异源蛋白产量提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和培养基

实验中使用的酿酒酵母菌株及来源见表 1。重组酿酒酵母出发菌株 Y294-CBH1、Y294-EG2 和 Y294-BGL1 分别为过表达埃默森篮状菌 (*Talaromyces emersonii*) 来源的外切纤维素酶 CBH1、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 来源的内切纤维素酶 EG2 和扣囊复膜酵母 (*Saccharomycopsis fibuligera*) 来源  $\beta$ -葡萄糖苷酶 BGL1 的酿酒酵母 Y294 菌株,由南非西开普敦大学 Riaan den Haan 博士提供。

培养大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  使用 LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 氯化钠 10.0, LB 固体培养基在液体培养基基础上

添加 20.0 g/L 琼脂粉。活化酿酒酵母和进行酶活性评价使用 YPD 培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 蛋白胨 20.0, 酵母浸粉 10.0, YPD 固体培养基在此基础上添加 20.0 g/L 琼脂粉。以上培养基均在  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 15 min。

### 1.2 主要试剂和仪器

蛋白胨、胰蛋白胨、酵母浸粉、琼脂粉、潮霉素 B、磷酸盐缓冲液(PBS)、柱式植物总 RNA 抽提纯化试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 葡萄糖、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、柠檬酸钠、柠檬酸、异丙醇、冰醋酸、乙醇, 国药集团; *Xma* I、*Pac* I 限制性内切酶、糖苷内切酶-H (Endoglycosase H, Endo-H), New England Biolabs 公司; T4 DNA 连接酶、反转录试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司; 诺尔丝菌素, 上海前尘生物科技有限公司; 4-硝基苯基- $\beta$ -D-纤维二糖 (4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-cellobioside, pNPC), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 (4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, pNPG)、羧甲基纤维素钠(CMCNa), Sigma 公司; iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green 试剂盒, Bio-Rad 公司; 活性氧检测试剂盒, 碧云天生物技术研究所以。

表 1 本文使用的酿酒酵母菌株及质粒

Table 1 Yeast strains and plasmids used in this study

Yeast strains and plasmids	Description	Source
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains		
S288C	Model organism	Laboratory preserve
Y294-CBH1	CBH1 ( <i>T. emersonii</i> CBH1) producing parental strain	From Dr. Riaan den Haan
Y294-EG2	EG2 ( <i>T. reesei</i> EG2) producing parental strain	From Dr. Riaan den Haan
Y294-BGL1	BGL1 ( <i>S. fibuligera</i> BGL1) producing parental strain	From Dr. Riaan den Haan
YCMHF1	Y294-CBH1 overexpressing <i>MHF1</i>	This study
YEMHF1	Y294-EG2 overexpressing <i>MHF1</i>	This study
YBMHF1	Y294-BGL1 overexpressing <i>MHF1</i>	This study
Plasmids		
Cas9-NAT	Nourseothrycin, expression of Cas9	[11]
pRS42h_gRNA_20	Hygromycin B, expression of gRNA in YPRCdelta 15	[12]
pHO	G418, integrating vector	[13]
HPC-MHF1	G418, overexpression of <i>MHF1</i>	This study

恒温培养箱, 上海一恒科技有限公司; 振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; 离心机, Eppendorf 公司; PCR Thermal Cycler, Bio-Rad 公司; 电泳仪, 北京六一仪器厂; 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海博讯实业有限公司; 凝胶成像仪, ProteinSimple 公司。

### 1.3 重组菌株构建

构建酿酒酵母 *MHF1* 过表达载体 HPC-MHF1: 从模式酿酒酵母菌株 S288C 的基因组中扩增得到 *MHF1* 基因片段, 再通过 *Xma*I 和 *Pac*I 限制性内切酶对 pHO 表达载体<sup>[13]</sup>进行酶切, 然后采用 T4 DNA 连接酶将 *MHF1* 基因片段与酶切的 pHO 表达载体<sup>[13]</sup>连接, 选取经 PCR 验证大小正确且送公司测序后无突变的过表达载体用于后续实验。以质粒 HPC-MHF1 为模板, 用引物 20\_Ppgk1-F 和 20\_Tcyc1-R<sup>[12]</sup>扩增得到用于同源重组的线性化片段, 整合位点选用酿酒酵母 S288C 第 XVI 染色体上的 YPRCdelta 15<sup>[14]</sup>。利用醋酸锂转化法<sup>[15]</sup>将 Cas9 表达载体 Cas9-NAT 转入酿酒酵母 Y294-CBH1、Y294-EG2 和 Y294-BGL1 后, 用 100 mg/L 诺尔丝菌素筛选得到转化子。再将 YPRCdelta 15 位点的 gRNA 表达载体 pRS42h\_gRNA\_20 和含有 *MHF1* 基因的 PCR 产物以相同的转化方法转入含有 Cas9 表达载体的转化子中; 用 100 mg/L 诺尔丝菌素和 300 mg/L 潮霉素 B 筛选转化子。从 Y294-CBH1、Y294-EG2 和 Y294-BGL1 这 3 个宿主的转化子中各随机挑选 3 个单克隆转化子分别命名为 YCMHF1、YEMHF1 和 YBMHF1, 提取基因组分别用 Ppgk1-F (5'-AGGCATTTGCAAG AATTACTCGTG-3')和 MHF1-R (5'-CCTTAATTA ATTATTCTTGAGTA ACTCTTTCCTGTAGGTCAG G-3')、MHF1-F (5'-TCCCCCGGGATGAATGACG ATGAAGATAG-3')和 Tcyc1-R (5'-GCAAATTAAG GCCTTCGAGC-3')两对验证引物通过 PCR 扩增转化元件并测序, 验证获得正确的转化子。将获得的转化子在无抗性 YPD 液体培养基中连续转接 5 次(每 18–24 h 转接一次), 丢失 Cas9 和 gRNA 的

游离表达载体<sup>[11]</sup>。采用实时定量 PCR 检测转化子中 *MHF1* 基因的表达量, 进一步验证获得转化子的准确性。

### 1.4 菌株酶活性评价

经二次活化后的酿酒酵母菌株接种于含 100 mL YPD 培养基的 250 mL 锥形瓶中, 30 °C、150 r/min 培养过夜至对数期, 4 °C、3 000 r/min 离心 3 min 收集菌体, 以初始  $OD_{600}$  为 1.0 接种于 100 mL YPD 培养基中, 于 30 °C、150 r/min 培养, 每组实验设 3 个重复。每隔 24 h 取 1 mL 发酵液, 稀释至  $OD_{600}$  在 0.2–0.8 之间时测定  $OD_{600}$ 。随后将剩余菌液 6 000 r/min 离心 5 min, 上清 4 °C 保存用于后续酶活性测定。

酶活性测定方法: CBH 酶活性测定以 pNPC 为反应底物, 用 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 5.0)将发酵液上清稀释 10 倍后, 加入 10 mmol/L pNPC, 在 50 °C 水浴锅中反应 60 min 后, 加入 10%  $Na_2CO_3$  终止反应, 充分混匀后在 405 nm 下测定光吸收值。用 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 5.0)配制 0.02 g/L pNP (p-Nitrophenyl)溶液并梯度稀释(具体稀释浓度为 0.002、0.004、0.006、0.008、0.01、0.012、0.015、0.018、0.02 g/L), 根据其在 405 nm 下的吸光值绘制标准曲线。将测得的样品吸光值根据标准曲线换算, 得到相应的酶活性。酶活性单位定义为每分钟生成 1  $\mu$ mol pNP 所需的酶量。BGL1 酶活性测定方法与 CBH1 相似, 只是将水解底物替换为 pNPG。EG2 酶活性测定以 2% CMCNa 为水解底物, 将 10  $\mu$ L 的酶液与 90  $\mu$ L 2%的 CMCNa 混合后于 50 °C 水浴 30 min, 加入 150  $\mu$ L DNS 煮沸 10 min 后, 再加入 750  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 混匀后测定  $OD_{540}$ , 酶活性单位定义为每分钟生成 1  $\mu$ mol 葡萄糖所需的酶量。发酵液上清的酶活性以每克细胞干重计量。

细胞干重测定方法: 菌株 30 °C、150 r/min 培养过夜, 待菌液长至对数期后室温 6 000 r/min 离心 5 min 收集适量的菌体细胞。ddH<sub>2</sub>O 洗菌体 2 次, 再用 ddH<sub>2</sub>O 重悬细胞至不同浓度并测定  $OD_{600}$ 。分

别取 12 mL 细胞悬液, 室温 6 000 r/min 离心 5 min 去除上清, 于 50 °C 烘干至恒重称重。根据得到的数据绘制相应  $OD_{600}$ -干重标准曲线。

### 1.5 SDS-PAGE 分析

经 YPD 在 30 °C、150 r/min 培养 96 h 后, 取 2 mL 发酵液上清即粗酶液, 冷冻干燥浓缩处理 24 h, 加 200  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 溶解, 取 20  $\mu$ L 浓缩酶液分别添加或不添加 Endo-H 在 37 °C 反应 1 h 后, 用 5% 浓缩胶和 10% 分离胶进行 SDS-PAGE。电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250 染色液[考马斯亮蓝 R-250 0.1% (质量体积比), 异丙醇 25% (体积比), 冰醋酸 10% (体积比)]染色, 经脱色液[冰醋酸 10% (体积比), 乙醇 5% (体积比)]脱色完全后, 观察条带并用凝胶成像仪拍照, 获得的胶图采用 ImageJ 软件进行灰度分析。

### 1.6 RNA 提取及实时定量 PCR (Real-time PCR)分析

分别在 24 h 和 48 h 取 4 mL 发酵液, 10 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, ddH<sub>2</sub>O 洗 2 遍后液氮冻存于 -80 °C 用于 RNA 提取。采用柱式植物总 RNA 抽提纯化试剂盒提取酵母菌株 RNA, 用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA 后, 再用 iQ<sup>TM</sup> SYBR® Green 试剂盒进行 Real-time PCR 反应, 以 *ALG9* 为内参基因, 以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算基因相对表达量<sup>[16]</sup>。

实验中使用的实时定量引物见表 2。统计分析采用 *t* 检验法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 1.7 胞内活性氧水平检测

分别在 24、48、72 和 96 h 取  $OD_{600}$  约为 1.0 的发酵液, 室温条件下 3 000 r/min 离心 3 min 收集菌体, 用 1 mol/L 的 PBS 洗涤细胞 2 次后, 采用活性氧检测试剂盒检测细胞胞内活性氧的水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 *MHF1* 过表达转化子验证及其对重组酵母菌株酶活性的影响

提取转化子基因组 DNA 验证 *MHF1* 的整合, PCR 产物电泳和测序结果显示, 挑取的所有转化子均正确。实时定量分析结果显示, *MHF1* 在 3 个产酶菌株中表达都上调, 24 h 和 48 h 转录水平都为对照菌株的 5–40 倍, 说明 *MHF1* 过表达转化子构建成功。

选取正确的转化子进行后续酶活性评价, 如图 1A 所示, *MHF1* 过表达突变体的生长与出发菌株基本一致, 在异源表达 EG2 和 BGL1 的菌株中过表达 *MHF1* 同样不影响宿主菌株的生长。与对照菌株相比, YCMHF1 菌株纤维二糖水解酶 CBH 的活性显著高于出发菌株, 发酵 96 h 时的酶活性是出发菌株的 1.38 倍(图 1B)。然而, *MHF1* 过表达

表 2 实验使用的实时定量引物

Table 2 Real-time PCR primers used in this study

Genes name	Primers name	Primers sequence (5'→3')
<i>ALG9</i>	RT-ALG9-F	ATCGTGAAATTGCAGGCAGCTTGG
	RT-ALG9-R	CATGGCAACGGCAGAAGGCAATAA
<i>MHF1</i>	RT-MHF1-F	CTGTGGATCCGTGTGGAAGA
	RT-MHF1-R	TCGCTCTTATTGACCACACCTC
<i>CBH1</i>	RT-CBH1-F	GTCCACGACGTCAACGGTTA
	RT-CBH1-R	CGTAGTCAGCACCGTCCAAG
<i>SSO2</i>	RT-SSO2-F	CGAAGACGCTCAGCAAGATG
	RT-SSO2-R	CAACCACAACGACAACAACAATAG
<i>SEC22</i>	RT-SEC22-F	CCAAGCCTACCGTAAGACCA
	RT-SEC22-R	TTGCTTGACACCTACAAGCTCT
<i>YPT32</i>	RT-YPT32-F	GCCATCACGTCTGCGTACTA
	RT-YPT32-R	CACGTTGTCATCTGCGTTCT
<i>ERV29</i>	RT-ERV29-F	ATCTGAATAAGTGGAAGCATTACC
	RT-ERV29-R	GAGAAATAACGCAAGCACATAAC

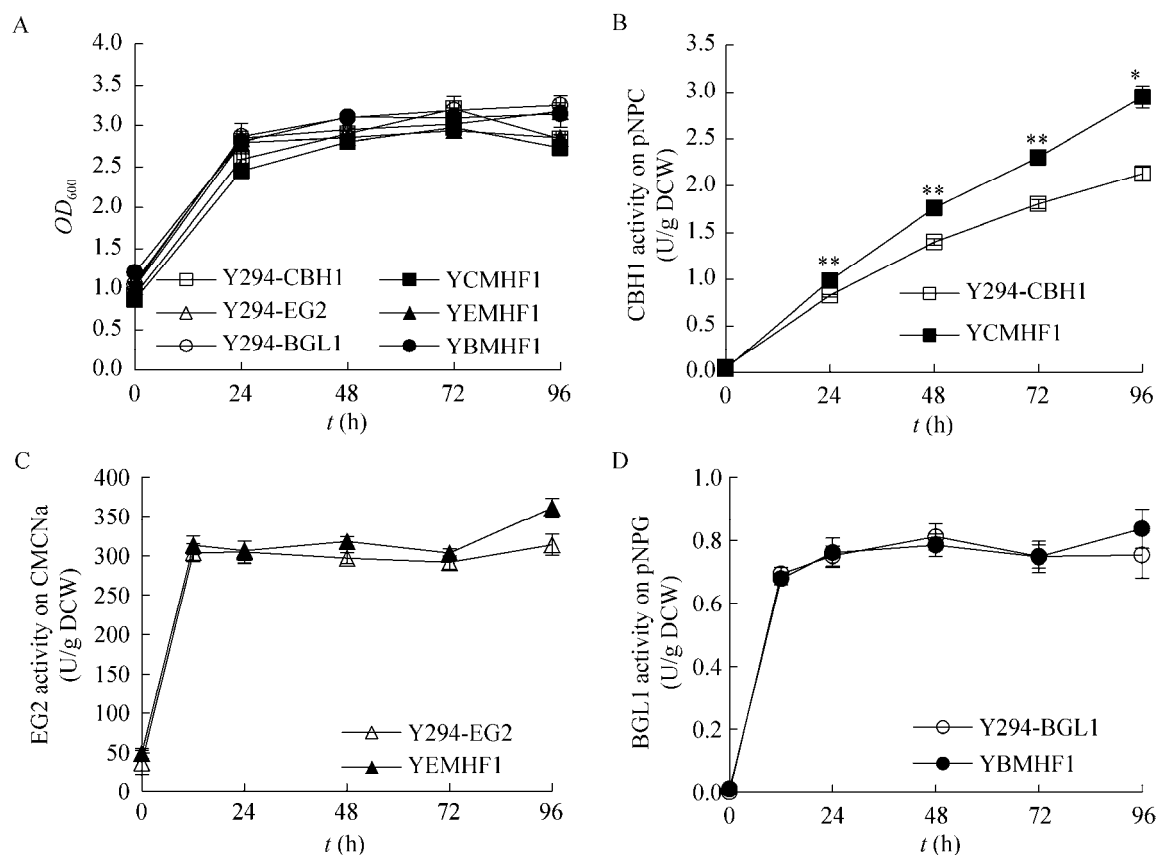


图1 *MHF1* 过表达菌株和对照菌株生长的比较及酶活性评价

Figure 1 Comparison of cell growth of the *MHF1* overexpressing strains with that of the parental strains and evaluation of enzyme activities

注: A: 菌株生长; B: CBH 酶活性结果; C: EG 酶活性结果; D: BGL 酶活性结果. 数据表示为均值 $\pm$ 标准差( $n=3$ ); \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$  vs Y294-CBH1.

Note: A: Cell growth analysis of the *MHF1* overexpressing strains; B–D: CBH, EG and BGL activities. Columns, mean of 3 independents ( $n=3$ ); Bars standard error of the mean. \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$  vs Y294-CBH1.

对内切酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的影响有限(图1C、D), 表明不同蛋白合成和分泌的限制因素不同, 与文献[17]报道的结果类似。

利用 SDS-PAGE 分析检测 CBH1 蛋白的含量, 结果如图 2A 所示, 并与文献[18]进行比较确认。与对照菌株相比, YCMHF1 菌株所产生的 CBH1 条带明显更亮, 灰度分析结果显示比对照提高了约 0.49 倍(图 2B), 表明分泌出来的目的蛋白含量增加, 与 CBH 酶活性高于对照菌株相互呼应, 说明过表达 *MHF1* 提高了目的蛋白的生产水平, 进而提高了宿主菌株胞外分泌纤维素外切酶的活性。

## 2.2 *MHF1* 过表达对重组酵母胞内活性氧水平的影响

由于在内质网中对蛋白质折叠需求的增加, 异源蛋白的生产往往导致活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的过量积累, 对酵母造成氧化损伤<sup>[19]</sup>。通过检测过表达菌株和出发菌株的胞内 ROS 水平发现, 随着发酵的进行和发酵液中 CBH 酶活性的提高, 越到发酵后期过表达菌株和出发菌株胞内 ROS 逐渐增加(图 3), 与文献[20]报道一致。虽然过表达菌株的 CBH 酶活性是对照菌株的 1.38 倍, 但其胞内活性氧的水平与对照菌株基本一致, 没有显著的提升。

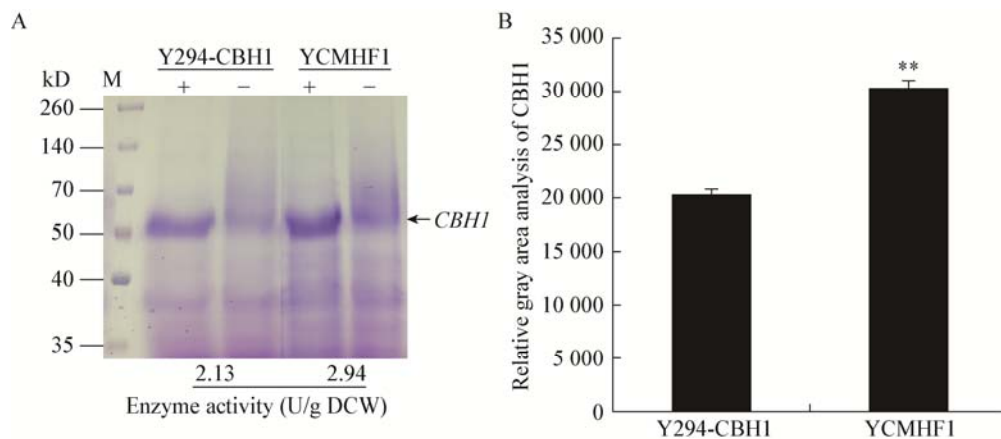


图 2 过表达 *MHF1* 菌株胞外蛋白分泌与对照菌株的比较

Figure 2 Secreted proteins of the parental strain and the *MHF1* overexpressing strain producing CBH

注: A: SDS-PAGE 蛋白电泳胶图结果. +: 样品添加 Endo-H; -: 样品不添加 Endo-H. B: 蛋白电泳胶图灰度分析. 数据表示为均值±标准差(n=3); \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$  vs Y294-CBH1.

Note: A: SDS-PAGE analysis results. +: Sample treated with Endo-H; -: Sample treated without Endo-H. B: Grayscale analysis results of SDS-PAGE. Columns, mean of 3 independents (n=3); Bars standard error of the mean. \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$  vs Y294-CBH1.

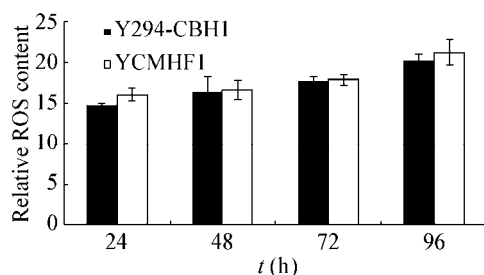


图 3 *MHF1* 过表达重组酵母菌株胞内活性氧水平与对照菌株 Y294-CBH1 的比较

Figure 3 Comparison of intracellular ROS level of the *MHF1* overexpressing strain with that of the parental strain Y294-CBH1

### 2.3 *MHF1* 过表达对重组酵母关键基因转录的影响

为了研究 *MHF1* 过表达提高酿酒酵母分泌表达 CBH 的机理, 首先对 CBH1 的编码基因进行了转录水平分析, 发现其在产酶中期显著上调。蛋白分泌途径与酿酒酵母异源蛋白生产的关系尤其密切, 现有研究表明, 对蛋白分泌途径进行改造可显著影响酿酒酵母异源蛋白的生产<sup>[3,21-23]</sup>。本文选择产酶初期(24 h)与中期(48 h)两个时间点对过表达

菌株和对照菌株细胞中与蛋白分泌途径相关基因的相对表达量进行了分析。结果如图 4 所示, SEC22 与 ERV29 参与从内质网到高尔基体之间蛋白的运输, 在产酶前期(24 h)显著上调, 介导高尔基体内部囊泡运输的 YPT32 以及参与分泌小泡和

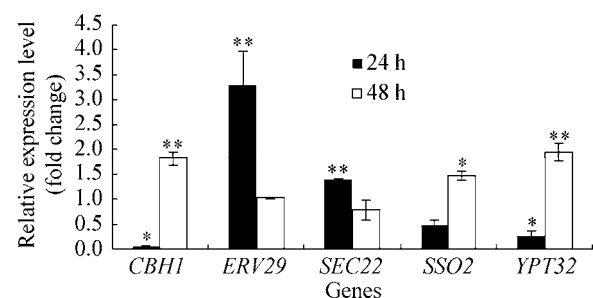


图 4 重组酵母菌株与对照菌株 CBH1 编码基因及蛋白运输相关基因转录水平的比较

Figure 4 Transcription levels of CBH1 encoding gene and genes involved in protein trafficking in the *MHF1* overexpressing strain comparing with the control strain Y294-CBH1

注: 数据表示为均值±标准差(n=3); \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$  vs Y294-CBH1.

Note: Columns, mean of 3 independents (n=3); Bars standard error of the mean. \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$  vs Y294-CBH1.

细胞膜融合蛋白 Sso2p 的编码基因 *SSO2*, 在产酶中期(48 h)显著上调。以上结果表明, 过表达 *MHF1* 增强了不同时间点和分泌途径相关的不同关键基因的表达量, 从而有助于异源蛋白的产生。

### 3 讨论与结论

异源蛋白生产影响细胞的全局代谢, 酿酒酵母在表达外源纤维素酶的同时, 伴随着蛋白的错误折叠和分泌增加, 由此引发宿主菌株的代谢负担<sup>[24]</sup>。这种代谢负担有可能影响基因组的稳定性。此外, 酵母蛋白过量外排的性状受到线粒体功能和基因组完整性的影响<sup>[25]</sup>。据推测, 随着异源蛋白质负载的增加, 将导致更多活性氧的释放<sup>[24]</sup>。Mhf1p 与 FANCM 直系同源物在同一途径中发挥作用, 修复由 DNA 损伤剂 MMS 引起的 DNA 损伤, 保护基因组的完整性<sup>[9]</sup>。有研究显示, 当细胞用 MMS 处理时会在细胞核及线粒体中积累活性氧, 而且过量积累的活性氧将引起线粒体基因组的不稳定性<sup>[26]</sup>, 因此, 过表达 *MHF1* 有可能通过降低活性氧的积累维持基因组的稳定性, 从而促进外源蛋白的分泌。前期研究过表达 *SEC16* 使蛋白分泌提高, 但是 ROS 积累未发生变化, 推测因为过表达突变体具有清除过表达蛋白产生的 ROS 的功能<sup>[20]</sup>。本文也得到类似的结果, 在异源表达外切纤维素酶的酿酒酵母中过表达 *MHF1* 后, 重组酵母菌株 CBH 的酶活性和蛋白外泌量明显高于对照菌株, 但其活性氧水平没有明显提升, 提示 *MHF1* 过表达可能有助于降低胞内活性氧的积累。但对过表达 *MHF1* 的 CBH 生产菌株进行抗氧化酶检测, 未发现超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性的变化(结果未显示)。 *MHF1* 过表达对重组菌株氧化胁迫反应和蛋白分泌途径的影响机理还有待进一步研究。

前期已经有很多相关的研究显示<sup>[3,21-23]</sup>, 对蛋白分泌途径进行改造可显著影响酿酒酵母异源蛋白的产生。过表达 *SNC1*、*SSO2* 和 *BET1* 可显著提高在酿酒酵母中异源表达 *CBH1* 的活性<sup>[21-22]</sup>; 过表

达 *SNC2*、*SSO1*、*SED5* 和 *SEC9* 可同时提高酿酒酵母中 CBH1 和 BGL1 的活性<sup>[3,21-22]</sup>; 过表达 *YPT32* 可提高来自热纤维梭菌 CelA 在酿酒酵母中异源表达的活性<sup>[3]</sup>。检测一些文献中报道的与囊泡运输途径相关基因如 *SNC1*、*SNC2*、*SEC9*、*BET1* 等的转录水平(结果未展示)发现, 这些基因表达的变化并不明显, 提示过表达 *MHF1* 对不同基因具有不同的调控机制。前期研究表明, 不同蛋白分泌的关键调控位点不同, 同一基因的过表达对不同酶的促进作用不一样<sup>[21-22]</sup>。后续研究将继续考察 *MHF1* 过表达对其他蛋白产生性能的影响, 为促进异源蛋白的产生奠定基础。研究者对囊泡运输过程的关键基因进行逐一过表达, 发现一些基因的过表达可提高不同酶的产生<sup>[3,21-23]</sup>。本研究不同之处在于, 通过一个基因的过表达, 可同时提高多个囊泡运输关键基因的表达, 实现对不同关键蛋白的平衡表达调控。

本研究发现在酿酒酵母中过表达 *MHF1* 可提高重组酿酒酵母 CBH 的酶活性, 并对促进产酶的机理进行了探讨, 发现了该基因作用的多效性。首次揭示了与 DNA 损伤修复和基因组稳定性相关的基因 *MHF1* 在异源蛋白产生中的作用, 提示相关过程可能与蛋白的产生和分泌有关。这些结果为深入研究酿酒酵母分泌表达异源蛋白的调控机理, 以及提高重组酿酒酵母生产纤维素酶等功能蛋白的效率提供了依据和思路。

致谢: 感谢南非西开普敦大学 Riaan den Haan 博士提供重组酵母 Y294-CBH1、Y294-EG2 和 Y294-BGL1 宿主菌株。

### REFERENCES

- [1] Wang GK, Huang MT, Nielsen J. Exploring the potential of *Saccharomyces cerevisiae* for biopharmaceutical protein production[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2017, 48: 77-84
- [2] 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
- [3] 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
- [4] Liu ZH, Keith EJT, Martínez JL, et al. Different expression systems for production of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2012, 109(5): 1259-1268
- [5] Valkonen M, Penttilä M, Saloheimo M. Effects of inactivation and constitutive expression of the unfolded- protein response pathway on protein production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(4): 2065-2072
- [6] Huang MT, Bao JC, Hallström BM, et al. Efficient protein production by yeast requires global tuning of metabolism[J]. Nature Communications, 2017, 8: 1131
- [7] 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
- [8] Hou J, österlund T, Liu ZH, et al. Heat shock response improves heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(8): 3559-3568
- [9] Yan ZJ, Delannoy M, Ling C, et al. A histone-fold complex and FANCM form a conserved DNA-remodeling complex to maintain genome stability[J]. Molecular Cell, 2010, 37(6): 865-878
- [10] Yang H, Zhang TL, Tao Y, et al. *Saccharomyces cerevisiae* MHF complex structurally resembles the histones (H3-H4)<sub>2</sub> heterotetramer and functions as a heterotetramer[J]. Structure, 2012, 20(2): 364-370
- [11] Zhang GC, Kong II, Kim H, et al. Construction of a quadruple auxotrophic mutant of an industrial polyploid *Saccharomyces cerevisiae* strain by using RNA-guided Cas9 nuclease[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(24): 7694-7701
- [12] Wan C, Wan QQ, Xiong L, et al. Improvement of acetic acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of mitochondrial ribosomal protein encoding gene *MRP8* for efficient lignocellulosic ethanol production[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2017, 15(5): 80-85 (in Chinese)  
万春, 万青青, 熊亮, 等. 过表达 *MRP8* 提高酿酒酵母乙酸耐性及乙醇发酵效率[J]. 生物加工过程, 2017, 15(5): 80-85
- [13] He LY, Zhao XQ, Ge XM, et al. Identification and functional study of a new *FLO10*-derivative gene from the industrial flocculating yeast SPSC01[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2012, 39(8): 1135-1140
- [14] Bai Flagfeldt D, Siewers V, Huang L, et al. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Yeast, 2009, 26(10): 545-551
- [15] Gietz RD, Schiestl RH. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method[J]. Nature Protocols, 2007, 2(1): 31-34
- [16] 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
- [17] Kroukamp H, den Haan R, la Grange DC, et al. Strain breeding enhanced heterologous cellobiohydrolase secretion by *Saccharomyces cerevisiae* in a protein specific manner[J]. Biotechnology Journal, 2017, 12(10): 1700346
- [18] Ilmén M, den Haan R, Brevnova E, et al. High level secretion of cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2011, 4: 30
- [19] Chakravarthi S, Jessop CE, Bulleid NJ. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress[J]. EMBO Reports, 2006, 7(3): 271-275
- [20] Bao JC, Huang MT, Petranovic D, et al. Moderate expression of *SEC16* increases protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(14): 3400-3416
- [21] van Zyl JHD, den Haan R, van Zyl WH. Overexpression of native *Saccharomyces cerevisiae* ER-to-Golgi SNARE genes increased heterologous cellulase secretion[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(1): 505-518
- [22] van Zyl JHD, den Haan R, van Zyl WH. Over-expression of native *Saccharomyces cerevisiae* exocytic SNARE genes increased heterologous cellulase secretion[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(12): 5567-5578
- [23] Hou J, Tyo K, Liu ZH, et al. Engineering of vesicle trafficking improves heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(2): 120-127
- [24] van Rensburg E, den Haan R, Smith J, et al. The metabolic burden of cellulase expression by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Y294 in aerobic batch culture[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(1): 197-209
- [25] Alexandar I, Venkov P, del Giudice A, et al. Protein overexport in a *Saccharomyces cerevisiae* mutant depends on mitochondrial genome integrity and function[J]. Microbiological Research, 2001, 156(1): 9-12
- [26] Yazgan O, Krebs JE. Mitochondrial and nuclear genomic integrity after oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Frontiers in Bioscience, 2012, 17(1): 1079-1093