

N-糖基化修饰对异源蛋白在毕赤酵母中表达的作用研究进展

韩铭海, 王未鲜, 于志海 (贵州理工学院, 贵州贵阳 550000)

摘要 毕赤酵母是目前工业上生产重组蛋白最常用的宿主之一, 而蛋白高水平表达技术一直是该领域的研究热点。目前, 成熟的分子生物学技术手段使改造 N-糖基化修饰位点成为一种操作性较强的提高目标蛋白表达水平的策略。综述了毕赤酵母中蛋白 N-糖链的结构、其介导的 CNX 循环和对蛋白折叠的作用以及通过 N-糖基化修饰位点改造促进蛋白表达的应用研究。

关键词 毕赤酵母; N-糖基化修饰; 异源蛋白; 蛋白折叠

中图分类号 Q78 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)11-0014-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2022.11.005

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Research Progress on the Effect of N-glycosylation on Production of Heterologous Proteins in *Pichia pastoris*

HAN Ming-hai, WANG Wei-xian, YU Zhi-hai (Guizhou Institute of Technology, Guiyang, Guizhou 550000)

Abstract *Pichia pastoris* is one of the most popular eukaryotic hosts for producing heterologous proteins. However, increased secretion of certain proteins valued for their applications is essential in this field. Due to promoted techniques in molecule biology, engineering N-glycosylation sites of target proteins was easily manipulated and an effective way to increase their productions. This paper reviewed the structure of N-glycan of glycoproteins in *Pichia pastoris*, the effect of its participation in CNX cycle on protein folding, and engineering N-glycosylation sites of the target proteins for stimulating their productions.

Key words *Pichia pastoris*; N-glycosylation; Heterologous protein; Protein folding

毕赤酵母(*Pichia pastoris*, 最新分类名为 *Komagataella pastoris* 或 *Komagataella phaffii*) 是科学研究和工业化生产蛋白类产品最常用的表达宿主。这种蛋白表达宿主具有高密度细胞培养、高效而可控的启动子、蛋白翻译后修饰、异源蛋白高效分泌表达、胞外蛋白易于分离和纯化以及公认的安全性等优点^[1], 是当今最受欢迎的蛋白表达体系之一^[2]。

获得高水平表达一直是商业化生产蛋白类产品的重要前提条件之一。当前, 提高毕赤酵母蛋白表达水平的主要技术有: 一是发酵条件优化策略, 包括培养基和发酵条件优化、诱导策略优化和高密度培养等传统手段^[3]; 二是分子生物学技术, 如优化密码子、选用强启动子和高效的信号肽、增加基因拷贝数等^[3-4]; 三是改造蛋白、折叠、修饰和分泌途径, 以提高细胞蛋白合成速度和产量^[3-4], 如通过共表达分子伴侣和 PDI^[5-6] 等来提高内质网对异源蛋白的加工和折叠。近期的研究表明, 在宿主细胞内质网中的错误折叠或是折叠的低效性是抑制某些异源蛋白高效表达的重要原因之一^[7-10]。

1 新生肽高效折叠是其高水平表达的关键

在真核细胞内质网(ER)中, 种类和数量较多的分子伴侣和辅助因子参与了新生肽的折叠加工, 而细胞严谨的质量控制(quality control)机制确保了多肽的正确折叠, 该复杂机制的低效性常常成为宿主表达蛋白的限速步骤^[7-10]。另外有研究表明, 通过采用优化启动子或增加基因拷贝数等策略, 可以促进毕赤酵母表达外源蛋白, 但相当含量的蛋白仍然滞留在胞内而未被分泌表达。究其原因, 可能是蛋白在内质网中不能快速折叠, 致使大量未折叠多肽聚集, 这是限制蛋白高效分泌表达的主要因素^[7-10]。肽链在 ER 中合成只需

数十秒至几分钟, 而新生肽在 ER 中停留时间可长达数十分钟, 最终, 只有正确折叠的多肽才能被细胞输送至高尔基体, 接受进一步的修饰加工, 非正确折叠蛋白被 ER 识别并进入内质网关联降解途径(ERAD), 被泛素缀合酶修饰, 最终在细胞质中被蛋白酶体彻底消化^[5,7,9]。因此, 提高新生肽折叠效率对蛋白的高水平表达至关重要。有研究表明, N-糖基化修饰对新生肽折叠有重要作用^[11-12]。

2 N-糖基化修饰对蛋白表达的作用

一般来说, N-糖基化修饰参与了蛋白质合成折叠和转运, 有助于酵母中蛋白质的高效表达和分泌^[13-14]。其作用主要有以下几个方面: 第一, 没有 N-糖链的协助将可能会严重影响新生肽折叠的效率, 而内质网内多肽的低效折叠将会被严格的内质网质量控制体系所识别, 从而可能进入 ERAD 途径而被降解^[15]; 第二, N-糖链上的甘露糖可以与 ERGIC-53 结合。ERGIC-53 是一种甘露糖凝集素受体, 在从内质网转运糖蛋白到高尔基体的过程中发挥重要作用^[16]; 第三, N-糖链可有效地屏蔽多肽表面的疏水性区域从而抑制蛋白的聚集^[17]。

2.1 毕赤酵母中糖蛋白的 N-糖链结构 自然界中, 蛋白糖基化修饰主要有两类: N-糖基化修饰和 O-糖基化修饰^[18]。在原核和真核生物中, O-糖基化是蛋白常见的翻译后修饰方式, 在酵母细胞中, O-糖基化主要形式是丝氨酸和苏氨酸羟基被 O-甘露糖基化修饰^[18]。毕赤酵母中蛋白 O-糖基化修饰广泛存在, 但没有 N-糖基化修饰普遍^[19]。

N-糖基化修饰是指 β -构型的 N-乙酰葡萄糖胺异头碳与天冬酰胺的 γ -酰胺 N 原子共价链接而成的 N-糖苷键修饰^[20]。在自然界中, 蛋白氨基酸序列 Asn-Xaa-Ser/Thr (Asn 为天冬酰胺, Xaa 是除了 Pro 以外任意氨基酸, Ser 为丝氨酸, Thr 为苏氨酸) 中, 高达 70%~90% 的天冬酰胺残基是被糖基化修饰的^[21]。

根据结构差异, N-糖链可分为 3 类: 高甘露糖型、复杂型

基金项目 国家自然科学基金项目(31760022); 贵州省科学技术基金资助项目(黔科合基础[2019]1146号)。

作者简介 韩铭海(1976—), 男, 江苏无锡人, 副教授, 博士, 从事毕赤酵母高效蛋白表达技术研究。

收稿日期 2021-12-13

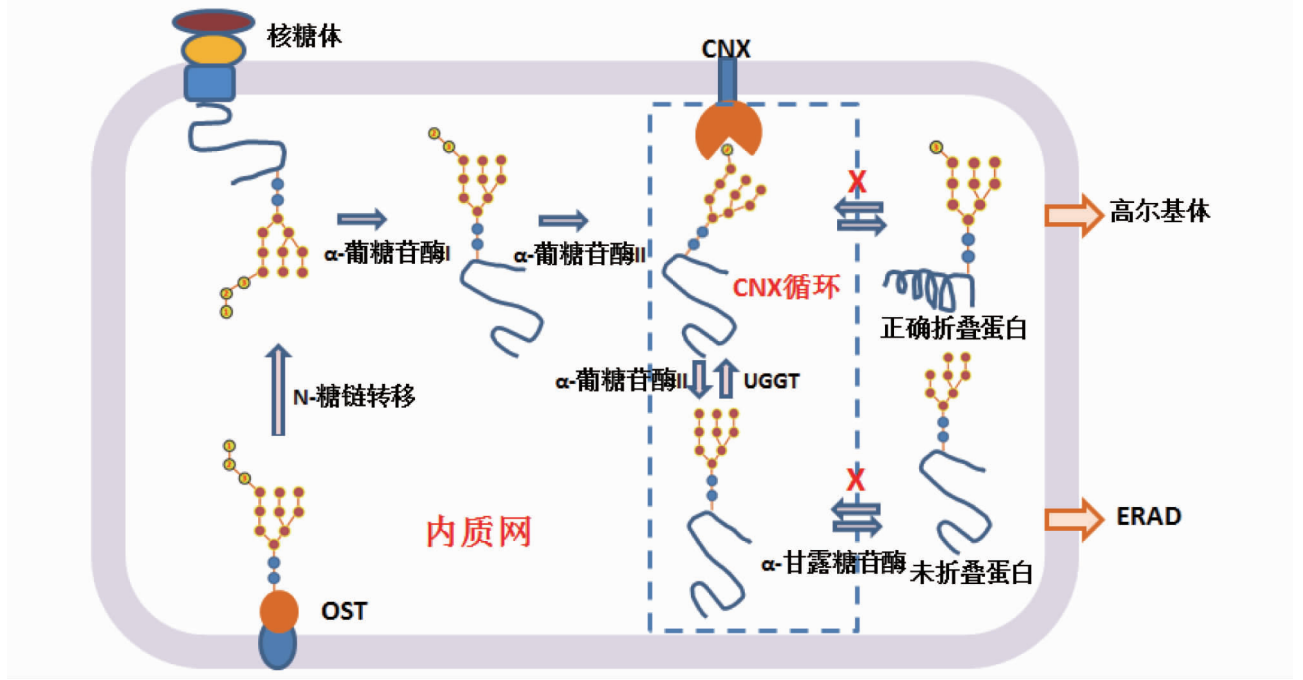


图2 N-糖链介导 CNX 循环

Fig. 2 N-glycan involved in CNX cycle

酵母中表达量的3倍;在破伤风毒素片段C蛋白Asn-320引入N-糖基化位点也抑制了其在毕赤酵母中的表达^[30]。Han等^[34]研究发现,在弹性蛋白酶Asn-67位点引入N-糖基化位点则完全抑制了其在毕赤酵母中的表达。

3.3 N-糖基化修饰对异源蛋白表达影响不显著 研究表明,一些蛋白的N-糖基化修饰与其分泌表达水平几乎没有关系。Ito等^[27]报道了卵清蛋白Asn-311位点的N-糖基化修饰不影响其在酿酒酵母中的分泌表达;Wang等^[35]研究发现,尿激酶的N-糖基化修饰对其在毕赤酵母中的表达没有显著影响。

3.4 提高N-糖基化位点的修饰效率促进异源蛋白表达 研究者通过定点突变的技术可以研究异源蛋白上N-糖基化修饰对其表达水平的影响,也可以去除或引入N-糖基化修饰位点以提高其表达水平。一旦确定有利的N-糖基化修饰位点,那么可以通过采用更高效的N-糖基化修饰序列Asn-Xaa-Thr替代Asn-Xaa-Ser以提高特定位点的N-糖基化修饰效率,以此来增强N-糖基化修饰促进蛋白的效应。Han等^[36]通过这种策略提高了弹性蛋白酶的N-糖基化修饰水平,而且也提高了其在毕赤酵母中的表达水平。另外,在N-糖基化修饰序列上游特定位点引入芳香族氨基酸序列也可以有效地提高N-糖基化位点的修饰效率^[37-38],可以推测,通过这种提高N-糖基化修饰效率的策略也可有效地促进目标蛋白的表达水平。

4 展望

毕赤酵母是目前工业上生产异源蛋白最常用的宿主,提高异源蛋白在毕赤酵母中的表达水平的新技术、新策略一直是该领域的研究热点。N-糖基化修饰是毕赤酵母细胞中最常见的翻译后修饰,N-糖链作为蛋白折叠的凝集素分子伴

侣,介导新生肽参与内质网蛋白折叠质量控制以及转运,因此对蛋白表达水平有着重要的影响。通过成熟分子生物学技术,研究者可以便捷地在目标蛋白的氨基酸序列中添加或是去除N-糖基化修饰位点,以研究其对蛋白表达水平的影响。已经有多篇文献报道了通过引入N-糖基化修饰位点提高目标蛋白表达水平的研究,因此,通过N-糖基化修饰位点的改造是一种有效地提高目标蛋白表达水平的策略。

另外,目前关于N-糖基化修饰作用于蛋白折叠表达的理论还不够完善,存在一定的不足。例如,CNX循环作用于新生肽的折叠过程与其N-糖链的蛋白位点特异性没有关联性,而实际研究发现,某些蛋白的不同位点N-糖链对其表达的作用是截然不同的。这些问题还有待研究者做进一步的研究以继续完善相关的理论,从而进一步优化通过N-糖基化位点改造促进蛋白表达的策略。

参考文献

- [1] MACAULEY-PATRICK S, FAZENDA M L, MCNEIL B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system[J]. *Yeast*, 2005, 22(4): 249-270.
- [2] BAGHBAN R, FARAJNIA S, RAJABIBAZL M, et al. Yeast expression systems: Overview and recent advances[J]. *Molecular biotechnology*, 2019, 61(5): 365-384.
- [3] IDIRIS 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.
- [4] YU P, ZHU Q, CHEN K F, et al. Improving the secretory production of the heterologous protein in *Pichia pastoris* by focusing on protein folding[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2015, 175(1): 535-548.
- [5] RUGGIANO A, FORESTI O, CARVALHO P. Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond[J]. *Journal of molecular biology*, 2014, 204(6): 869-879.
- [6] SCHRÖDER M. Engineering eukaryotic protein factories[J]. *Biotechnology letters*, 2008, 30(2): 187-196.
- [7] KITAMURA M. The unfolded protein response triggered by environmental factors[J]. *Seminars in immunopathology*, 2013, 35(3): 259-275.
- [8] ARAKI K, NAGATA K. Protein folding and quality control in the ER[J].

- Cold spring harbor perspectives in biology, 2011, 3(11):1-25.
- [9] PREISSLER S, RON D. Early events in the endoplasmic reticulum unfolded protein response[J]. Cold spring harbor perspectives in biology, 2019, 11(4):1-18.
- [10] CEREGHINO J L, CREGG J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. FEMS microbiology reviews, 2000, 24(1):45-66.
- [11] TANNOUS A, PISONI G B, HEBERT D N, et al. N-linked sugar-regulated protein folding and quality control in the ER[J]. Seminars in cell & developmental biology, 2015, 41:79-89.
- [12] GE F, ZHU L B, AANG A N, et al. Recent advances in enhanced enzyme activity, thermostability and secretion by N-glycosylation regulation in yeast[J]. Biotechnology letters, 2018, 40(5):847-854.
- [13] ROTH J, ZUBER C, PARK S, et al. Protein N-glycosylation, protein folding, and protein quality control[J]. Molecules and cells, 2010, 30(6):497-506.
- [14] PUXBAUM V, MATTANOVICH D, GASSER, B. Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris* [J]. Applied microbiology & biotechnology, 2015, 99(7):2925-2938.
- [15] KOSTOVA Z, WOLF D H. For whom the bell tolls: Protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection [J]. EMBO journal, 2003, 22(10):2309-2317.
- [16] HAURI H P, APPENZELLER C, KUHN F, et al. Lectins and traffic in the secretory pathway[J]. FEBS letters, 2000, 476(1/2):32-37.
- [17] DE POURCQ K, DE SCHUTTER K, CALLEWAERT N. Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: Current state and perspectives[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2010, 87(5):1617-1631.
- [18] KIELISZEWSKI M J. The latest hype on Hyp-O-glycosylation codes[J]. Phytochemistry, 2001, 57(3):319-323.
- [19] BRETTHAUER R K, CASTELLINO F J. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins [J]. Applied biochemistry and biotechnology, 1999, 30(3):193-200.
- [20] SKROPETA D. The effect of individual N-glycans on enzyme activity[J]. Bioorganic & medicinal chemistry, 2009, 17(7):2645-2653.
- [21] GEMMILL T R, TRIMBLE R B. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species[J]. Biochimica et biophysica acta, 1999, 1426(2):227-237.
- [22] IMPERIALI B, O'CONNOR S E. Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure[J]. Current opinion in chemical biology, 1999, 3(6):643-649.
- [23] LEDERKREMER G Z. Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation[J]. Current opinion in structural biology, 2009, 19(5):515-523.
- [24] BRAAKMAN I, HEBERT D N. Protein folding in the endoplasmic reticulum[J]. Cold spring harbor perspectives in biology, 2013, 5(5):1-17.
- [25] HAN M H, WANG X F, DING H Y, et al. The role of N-glycosylation sites in the activity, stability, and expression of the recombinant elastase expressed by *Pichia pastoris* [J]. Enzyme and microbial technology, 2014, 54:32-37.
- [26] YANG M, YU X W, ZHENG H Y, et al. Role of N-linked glycosylation in the secretion and enzymatic properties of *Rhizopus chinensis* lipase expressed in *Pichia pastoris* [J]. Microbial cell factories, 2015, 14(1):1-14.
- [27] ITO K, ISHIMARU T, KIMURA F, et al. Importance of N-glycosylation positioning for secretion and folding of ovalbumin[J]. Biochemistry and biophysical research communications, 2007, 361(3):725-731.
- [28] SAGT C M, KLEIZEN B, VERWAAL R, et al. Introduction of an N-glycosylation site increases secretion of heterologous proteins in yeasts[J]. Applied and environmental microbiology, 2000, 66(11):4940-4944.
- [29] WEI W, CHEN L, ZOU G, et al. N-glycosylation affects the proper folding, enzymatic characteristics and production of a fungal β -glucosidase [J]. Biotechnology and bioengineering, 2013, 110(12):3075-3084.
- [30] WANG N, WANG K Y, XU F F, et al. The effect of N-glycosylation on the expression of the tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* [J]. Protein expression and purification, 2020, 166:1-7.
- [31] HAN M H, WANG W X, JIANG G C, et al. Enhanced expression of recombinant elastase in *Pichia pastoris* through addition of N-glycosylation sites to the propeptide [J]. Biotechnology letters, 2014, 36(12):2467-2471.
- [32] LIU Y, XIE W P, YU H W. Enhanced activity of *Rhizomucor miehei* lipase by deglycosylation of its propeptide in *Pichia pastoris* [J]. Current microbiology, 2014, 68(2):186-191.
- [33] HOSHIDA H, FUJITA T, CHA-AIM K, et al. N-glycosylation deficiency enhanced heterologous production of a *Bacillus licheniformis* thermostable α -amylase in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2013, 97(12):5473-5482.
- [34] HAN M H, WANG X F, YAN G L, et al. Modification of recombinant elastase expressed in *Pichia pastoris* by introduction of N-glycosylation sites [J]. Journal of biotechnology, 2014, 171:3-7.
- [35] WANG P, ZHANG J, SUN Z, et al. Glycosylation of prourokinase produced by *Pichia pastoris* impairs enzymatic activity but not secretion [J]. Protein expression and purification, 2000, 20(2):179-185.
- [36] HAN M H, WANG W X, WANG X F, et al. Enhanced expression of recombinant elastase in *Pichia pastoris* through the substitution of Thr for Ser in Asn-Xaa-Ser sequons [J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2015, 175(1):428-435.
- [37] AGUILA S, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ I, DICHARA G, et al. Increased N-glycosylation efficiency by generation of an aromatic sequon on N135 of antithrombin [J]. PLoS One, 2014, 9(12):1-14.
- [38] MURRAY A N, CHEN W T, ANTONOPOULOS A, et al. Enhanced aromatic sequons increase oligosaccharyltransferase glycosylation efficiency and glycan homogeneity [J]. Chemistry & biology, 2015, 22(8):1052-1062.
- [49] SINGH S, DATTA P. Screening and selection of most potent diazotrophic cyanobacterial isolate exhibiting natural tolerance to rice field herbicides for exploitation as biofertilizer [J]. Journal of basic microbiology, 2006, 46(3):219-225.
- [50] ZAIN M, MOHAMAD R B, SIJAM K, et al. Growth-inhibitory effects of herbicides on soil bacterial population in oil palm plantation [J]. Journal of pure and applied microbiology, 2013, 7(3):1799-1808.
- [51] 孙淑清, 刘限, 姚远, 等. 莠去津和烟嘧磺隆对玉米田土壤微生物的影响[J]. 农药, 2014, 53(4):276-279.
- [52] 王建良. 一种纳米除草剂及其制备方法: CN201410634900. 1 [P]. 2016-05-25.
- [53] 李世奎, 李琳, 赵娜娜, 等. 两性氟乐灵/羧甲基壳聚糖载药纳米粒子的制备及缓释性能[J]. 农药, 2018, 57(8):564-567.
- [54] GAO C, HUANG Q X, LAN Q P, et al. A user-friendly herbicide derived from photo-responsive supramolecular vesicles [J]. Nature communications, 2018, 9:1-13.
- [55] 肖丹凤, 张佩胜, 王玲, 等. 中国稻瘟病菌种群分布及优势生理小种的研究进展[J]. 中国水稻科学, 2013, 27(3):312-320.
- [56] 邹阳, 肖崇刚, 马冠华, 等. 青枯菌生理分化及致病型测定研究进展[J]. 中国植保导刊, 2016, 36(7):21-28.
- [57] GUILBAULT G G, PRAVDA M, KREUZER M, et al. Biosensors-42 years and counting [J]. Analytical letters, 2004, 37(8):1481-1496.
- [58] 蒋雪松, 王剑平, 应义斌, 等. 用于食品安全检测的生物传感器的研究进展[J]. 农业工程学报, 2007, 23(5):272-277.

(上接第 13 页)

- [40] 耿青君, 崔建升, 段莉丽, 等. 藻叶绿素荧光检测除草剂生物毒性进展[J]. 煤炭与化工, 2019, 42(8):143-145.
- [41] 邓海华, 曾练强, 邝乐生. 绿藻生物测定法定量测定阿特拉津的研究[J]. 甘蔗糖业, 2000(5):19-25.
- [42] 阮祚禧, BROWN M T. 草甘膦对可食用蓝藻葛仙米生长和生理的影响[J]. 水生生物学报, 2008, 32(4):462-468.
- [43] NOVIS P M, HALLE C, WILSON B, et al. Identification and characterization of freshwater algae from a pollution gradient using *rbcl* sequencing and toxicity testing [J]. Archives of environmental contamination and toxicology, 2009, 57(3):504-514.
- [44] 叶丹, 陈洁, 袁琳, 等. 除草剂对 3 种绿藻的毒性测试研究[J]. 人民长江, 2014, 45(18):82-86.
- [45] 陈小娟, 潘晓洁, 邹阳, 等. 阿特拉津的在线监测预警方法初探[J]. 三峡生态环境监测, 2016, 1(3):1-7.
- [46] 赵德华, 崔建升, 段莉丽, 等. 藻类叶绿素荧光对除草剂生物毒性响应特性的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(9):2820-2877.
- [47] 郑凯, 马晓妍, 郝丽伟, 等. 基于叶绿素荧光成像技术的藻毒性检测法的建立及在环境监测中的应用[J]. 环境科学学报, 2019, 39(3):768-773.
- [48] THOMAS M C, FLORES F, KASERZON S, et al. Toxicity of ten herbicides to the tropical marine microalgae *Rhodomonas salina* [J]. Scientific reports, 2020, 10(1):1-16.