

# 用于异源基因表达的毕赤酵母启动子研究进展

金晓媚, 马雁冰\*

(中国医学科学院 & 北京协和医学院医学生物学研究所, 云南 昆明 650118)

**摘要** 甲醇营养型毕赤酵母是一个广泛使用的蛋白表达宿主系统, 易于高密度发酵、具有真核细胞翻译后加工修饰特点, 适于异源蛋白分泌表达。转录调控是控制蛋白高效表达的关键环节, 启动子是其中重要的元件。毕赤酵母表达系统中应用最为广泛的是甲醇诱导型 AOX1 启动子和组成型的 GAP 启动子, 已成功用于一些异源蛋白的表达。近年来, 发现了其他一些可供利用的启动子, 包括来自管家基因的启动子如 TEF、PGK1, 以及具有特殊调控机制的启动子如 FLD、PHO89 等。此外, 通过对启动子进行序列改造, 构建启动子文库, 实现了对启动子的精细调控。不同的启动子具有各自独特的调控机制与特点, 就毕赤酵母启动子在异源蛋白表达应用中的相关研究进展进行综述。

**关键词** 毕赤酵母; 启动子; 蛋白表达

中图分类号 Q939.5 文献标识码 A 文章编号 1005-7021(2015)03-0071-04

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2015.03.013

## Advances in *Pichia pastoris* Promoters Used for Heterogeneous Gene Expression

JIN Xiao-mei, MA Yan-bing

(Inst. of Med. Biol., Chinese Acad. of Med. Sci. & Peking Union Med. Coll., Kunming 650118)

**Abstract** Methylophilic *Pichia pastoris* is a host system widely used for protein expression. With its properties of easily fermented in high density and processing modification after eukaryotic cells interpretation, it is suitable for the expression of heterogeneous protein (Hp). Transcriptional regulation is a crucial link for efficient protein expression, and promoter is the most important element. Methanol inducible promoter AOX1 and constitutive promoter GAP are the most widely used promoters in *P. pastoris* expression system, which had been successfully used for expressing Hp. Recently, some alternative promoters have been found, including the promoters from housekeeping gene e.g. TEF, PGK1, and the promoters having the special regulation characterization e.g. FLD, PHO89, and so on. Through promoter sequence transformation, construction of promoter library has realized fine regulation of promoters. Different promoters individually have their specific regulation mechanisms and regulation characteristics. The application of *P. pastoris* promoters for expressing Hp in related research progress were reviewed in this paper.

**Keywords** *Pichia pastoris*; promoter; protein expression.

毕赤酵母表达系统能有效地分泌异源蛋白, 并进行真核翻译后修饰, 操作简便易于实现高密度发酵, 且不产生内毒素及哺乳动物细胞核酸成分等<sup>[1]</sup>, 是一个被广泛应用的蛋白表达系统。转

录是基因表达调控最关键的环节之一, 启动子可显著影响异源基因转录的起始、水平及持续, 从而直接影响异源蛋白的表达效率。毕赤酵母中最常用、最强的启动子是醇氧化酶 1 型启动子 (alcohol

基金项目: 云南省应用基础研究面上项目(2010ZC232); 中央高校基本科研业务费(2012N08)

作者简介: 金晓媚 女, 硕士研究生。从事生物化学与分子生物学研究。Tel: 0871-6833987, E-mail: jinforevermark@126.com

\* 通讯作者。男, 研究员, 硕士生、博士生导师。从事生物化学与分子生物学研究。Tel: 0871-68339287, E-mail: may@imbcams.com.cn

收稿日期: 2014-03-28; 修回日期: 2014-07-25

oxidase 1 promoter, AOX1)<sup>[2]</sup>, 研究人员围绕其顺式作用元件和反式作用因子开展了大量研究, 对其转录调控机制有较为深入的了解, 有效指导了该启动子在异源基因表达中的应用。甘油醛-3-磷酸脱氢酶启动子 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter, GAP) 是另一个常用的毕赤酵母启动子, 其无需诱导, 对于无毒性蛋白的表达具有简便、经济的优势。近年来, 还发现了其他一些可供利用的毕赤酵母启动子, 包括来自管家基因的启动子 (TEF、PGK1) 和具有特殊调控机制的启动子 (FLD、PHO89、THI1) 等。最近, 还发现了较强的组成型启动子 GCW14。通过对毕赤酵母启动子 AOX1 和 GAP 进行序列改造, 构建启动子文库, 实现了对启动子的精细调控。通过对新启动子的发掘以及对其调控机制的了解, 有助于充分利用不同启动子的特点、实现异源蛋白的高效表达。本文就毕赤酵母启动子的研究进展进行综述。

## 1 经典的启动子

### 1.1 AOX1 启动子

AOX1 启动子下游基因编码的醇氧化酶 1 参与酵母甲醇代谢的第一步反应, 将甲醇氧化为甲醛<sup>[3]</sup>。醇氧化酶 1 与甲醇结合的亲和力较弱, 甲醇代谢需要大量的醇氧化酶 1 存在, 因此, AOX1 启动子能强烈地被甲醇诱导, 其下游基因转录产物占细胞全部 mRNA 的 5%, 醇氧化酶 1 占细胞全部可溶性蛋白的 30%。AOX1 启动子受到严谨的调控, 在抑制性碳源 (如葡萄糖、甘油和乙醇) 下, 转录受到抑制, 当抑制性碳源去除后, AOX1 仅有 2%~4% 的转录活性, 而当甲醇加入后其转录活性达到 100%。

### 1.2 GAP 启动子

在毕赤酵母中应用最广泛的一个组成型启动子是 GAP 启动子, 由 Waterham. H. R. 于 1997 年通过使用酿酒酵母 TDH3 基因探针和毕赤酵母基因组进行单杂交, 成功地从毕赤酵母中分离得到<sup>[4]</sup>。GAP 启动子下游基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 主要参与糖酵解和糖质新生。GAP 启动子受碳源调控<sup>[4]</sup>, 有研究表明, 在葡萄糖条件下, 其转录水平最高, 其次是甘油、油酸, 甲醇最低。溶氧水平对 GAP 启动子转录调控也有一定

影响。低溶氧量有利于一些较难表达的蛋白, 如 Fab 片段的表达, 其表达量可以达到 15 g/L。GAP 启动子操作简便、无需诱导, 适用于大规模、高密度连续发酵培养。目前已有许多 GAP 启动子商业化载体, 如 pGAPZa、b、c (Invitrogen), pHWO10 等, 并且也已成功地表达了各种蛋白, 如在毕赤酵母中表达葡萄孢属的漆酶, 活性可以达到 41.3 U/mg, 远高于 AOX1 启动子调控下的 14.2 U/mg<sup>[5]</sup>。

## 2 其他毕赤酵母启动子

### 2.1 FLD 启动子

1998 年, Shen 等<sup>[6]</sup>报道了毕赤酵母中的一个新的诱导型启动子, 即谷胱甘肽依赖的甲醛脱氢酶启动子 (glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase promoter, FLD)。FLD 启动子既参与酵母碳源代谢, 又参与酵母氮源代谢。FLD 启动子下游的 FLD 基因通过氧化醇氧化酶氧化产物甲醛以及氧化过氧化胺酶释放的甲醛分别参与酵母甲醇和烷胺类物质代谢。FLD 启动子能够独立地被以甲醇作为唯一的碳源 (硫酸铵作为氮源) 或甲胺作为唯一的氮源 (葡萄糖作为碳源) 强烈诱导。FLD 启动子受甲醇调控的水平主要取决于所使用的氮源, 研究表明使用甲醇和甲胺一起诱导比用甲醇和硫酸铵的表达水平高<sup>[7-8]</sup>, 其受甲醇和甲胺诱导的水平和 AOX1 启动子相当。

### 2.2 PGK1 启动子

通过与酿酒酵母进行微阵列杂交, 发现了毕赤酵母 3-磷酸甘油酸激酶启动子 (PGK1)<sup>[9]</sup>。该组成型启动子下游基因 PGK1 参与糖酵解和葡萄糖异生代谢。在以糖酵解代谢途径为主的酵母中, 在糖酵解底物如葡萄糖、甘油存在下, PGK1 mRNA 表达水平高; 而在以葡萄糖异生为主要代谢途径的酵母中, 在葡萄糖异生底物如丙酮酸和醋酸存在下, PGK1 mRNA 表达水平高<sup>[10]</sup>。研究表明, 在葡萄糖培养下, PGK1 mRNA 水平是甘油培养下的 2 倍。该启动子已被开发为载体单元, 在多种酵母中均有应用, 如酿酒酵母、解脂耶氏酵母、麦芽糖假丝酵母。

### 2.3 TEF 启动子

翻译延伸因子 1- $\alpha$  (Translation elongation factor 1 alpha, TEF1- $\alpha$ ) 是真核翻译元件的重要组成部分。它介导氨酰 tRNAs 转运到核糖体上, 维持

肽链的延伸,是真核细胞内大量存在的可溶性蛋白。研究表明<sup>[11-42]</sup>,组成型 TEF 启动子的表达模式具有生长相关性,细胞在指数增长期 TEF 的 mRNA 水平高于平台期,而转录水平在指数增长早期、中期和晚期都一致。高浓度葡萄糖可影响 TEF 启动子的活性。使用 TEF1- $\alpha$  启动子表达脂肪酶,在甘油培养下,可以达到 410 U/mL 的脂肪酶活性,在葡萄糖培养下达到 226 U/mL 脂肪酶活性。

## 2.4 PHO89 启动子

毕赤酵母磷酸应答基因 PHO89 编码一个 Na<sup>+</sup> 偶联的磷酸转运子。诱导型 PHO89 启动子<sup>[13-14]</sup>受磷酸浓度的调控。在磷酸浓度受限下,适当的磷酸浓度能提高蛋白表达,过低或过高的磷酸浓度都会抑制蛋白表达。PHO89 启动子调控蛋白表达具有更高的单位产率。在发酵培养基下,每小时每单位细胞干重所产生的脂肪酶酶活可达到 219.6 U,明显高于 TEF 启动子调控下的 30.1 U 和 GAP 启动子调控下的 13.5 U。

## 2.5 THI11 启动子

THI11 启动子是通过微阵列杂交获得的<sup>[15]</sup>。该启动子参与硫胺素(维生素 B<sub>1</sub>)前体的合成。THI11 启动子对培养基中硫胺素浓度产生应答,在硫胺素限制条件下起始转录功能。在较低的生长速率下,THI11 启动子调控的蛋白较之高增长速率时表达增加。在 THI11 启动子调控下,HSA(人血清白蛋白)的表达量可达 31.3 mg/L,仅次于 TEF 启动子和 GAP 启动子。

## 2.6 GCW14 启动子

Liang 等<sup>[16]</sup>于毕赤酵母中发现了一个新的组成型启动子 PGCW14。该启动子的转录调控效率比经典的组成型启动子 TEF 和 GAP 高。PGCW14 启动子在甘油培养条件下具有很高的表达水平,在甲醇条件下,GCW14 基因的转录水平略低于 AOX1 基因。

## 3 合成的启动子和启动子变异体

天然的启动子用于异源蛋白表达可能具有一定的局限性,通过对启动子进行改造,获得了一些较野生型启动子具有更高转录效率的启动子变异体;将一些顺式作用元件插入到核心启动子区域得到的合成启动子能够通过简单的去抑制作用替

代甲醇进行诱导,从而避免有毒性、挥发性的甲醇的使用,能够严格调控基因表达<sup>[17]</sup>。Hartner 等<sup>[18]</sup>构建的 AOX1 启动子文库的转录效率与野生型相比在 6% 至 160% 的范围内变动。Qin 等<sup>[19]</sup>借鉴 Hartner 的方法,使用 EGFP 作为报告基因,构建了包含有 33 个突变体的 GAP 启动子文库,其转录效率是野生型的 0.6 ~ 19.6 倍。

## 4 展望

尽管毕赤酵母启动子 AOX1 是一个极强的启动子,已广泛而成功地应用于多种蛋白的表达。但 AOX1 的应用存在一定缺陷,如需要使用甲醇进行诱导,而甲醇易挥发、易燃、有毒等特性限制了 AOX1 的更广泛应用。另外, AOX1 参与醇氧化代谢途径,所产生的过氧化、活性氧产物的大量积累,会对宿主菌生长产生非常不利的影 响。因此,仍需要发掘可替代 AOX1 的有效启动子以适于应用。此外,对于较难表达或存在分泌瓶颈的蛋白,一个弱的启动子使得分泌表达的蛋白能够有效折叠,更利于蛋白表达;对于无毒性的蛋白,其表达对宿主细胞生长无负影响,组成型启动子无需诱导,简化了蛋白表达过程,利于连续高密度发酵,同时也显著节约了生产成本。考虑到不同启动子参与调控不同的生命活动,具有各自独特的调控机制与功能特点,因此,从毕赤酵母中分离或者改造获得更多新的启动子,并充分研究、发挥各自的特点,针对不同的表达应用需求,选择恰当的启动子或者联合应用不同调控特点的启动子,将有助于显著提升对异源基因的高效表达技术与能力。

## 参考文献:

- [1] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. FEMS Microbiology Rev, 2000, 24(1): 45-66.
- [2] Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, et al. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris* [J]. Molecular and Cellular Biology, 1985, 5(5): 1111-1121.
- [3] Tschopp JF, Brust PF, Cregg JM, et al. Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris* [J]. Nucleic Acids Res, 1987, 15(9): 3859-3876.
- [4] Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter [J]. Gene, 1997, 186

- (1):37-44.
- [5] Roman Kittl, Christoph Gonaus, Christian Pillei, et al. Constitutive expression of Botrytis aclada laccase in *Pichia pastoris* [J]. Bioengineered, 2012, 3:4, 232-235.
- [6] Shen S, Sulter G, Jeffries TW, et al. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris* [J]. Gene, 1998, 216(1):93-102.
- [7] Resina D, Cos O, Ferrer P, et al. Developing high cell density fed-batch cultivation strategies for heterologous protein production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated FLD1 promoter [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 91(6):760-767.
- [8] Resina D, Maurer M, Cos O, et al. Engineering of bottlenecks in *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated FLD1 promoter [J]. New Biotechnology, 2009, 25(6):396-403.
- [9] de Almeida JRM, de Moraes LMP, Torres FAG. Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. Yeast, 2005, 22(9):725-737.
- [10] Lee SJ, Hong IP, Baek SY, et al. Deletion analysis of *Pichia* PGK1 promoter and construction of an episomal vector for heterologous protein expression in *P. pastoris* [J]. Korean Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 35(3):184-190.
- [11] Ahn J, Hong J, Lee H, et al. Translation elongation factor1-alpha gene from *Pichia pastoris*: molecular cloning, sequence, and use of its promoter [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(3):601-608.
- [12] Lee HW, Ahn JO, Jung JK, et al. Translational elongation factor promoter from *Pichia pastoris* and method for producing recombinant protein using the same [P]. United States Patent, US7816509 B2, Oct. 19, 2010.
- [13] Ahn J, Hong J, Park M, et al. Phosphate-responsive promoter of a *Pichia pastoris* sodium phosphate symporter [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 75(11):3528-3534.
- [14] Lee HW, Ahn JO, Jung JK, et al. Auto-inducible sodium phosphate symporter promoter from *Pichia pastoris* and method for producing recombinant protein using it [P]. United States Patent, US8080389B2, Dec. 20, 2011.
- [15] Stadlmayr G, Mecklenbräuker A, Rothmüller M, et al. Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production [J]. Journal of Biotechnology, 2010, 150(4):519-529.
- [16] Liang S L, Zou C J, Lin Y, et al. Identification and characterization of PGCW14: a novel strong constitutive promoter of *Pichia pastoris* [J]. Biotechnol Lett, 2013, 35(11):1865-1871.
- [17] Ruth C, Zuellig T, Mellitzer A, et al. Variable production windows for porcine trypsinogen employing synthetic inducible promoter variants in *Pichia pastoris* [J]. Systems and Synthetic Biology, 2010, 4(3):181-191.
- [18] Hartner FS, Ruth C, Langenegger D, et al. Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris* [J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(12):e76.
- [19] Qin X L, Qian J C, Yao G F, et al. GAP Promoter Library for Fine-Tuning of Gene Expression in *Pichia pastoris* [J]. Applied and environmental microbiology, 2011, 77(11):3600-3608.