毕赤酵母外源蛋白分泌途径的研究进展

刘 冰，黄志强，郑 潇，张建国*

（上海理工大学 医疗器械与食品学院 食品科学与工程研究所，上海 200093）

摘 要 毕赤酵母作为一种重要的表达外源蛋白的宿主，提高其外源蛋白的分泌量非常有必要。近年来很多学者报道了与毕赤酵母外源蛋白分泌相关的基因、蛋白质，同时毕赤酵母基因组的公布加快了这方面的研究进展。文章根据外源蛋白分泌的途径，分步骤地总结了涉及的基因和蛋白，有利于分析控制蛋白分泌效率的具体步骤，为构建更加高效的毕赤酵母表达系统提供参考。

关键词 毕赤酵母；外源蛋白；分泌途径；分子伴侣；蛋白转运

中图分类号 Q939.97 **文献标识码** A **文章编号** 1005-7021(2019)04-0083-08

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2019.04.014

Advances in Heterologous Protein Secretory Pathway from *Komagataella phaffii*

LIU Bing, HUANG Zhi-qiang, ZHENG Xiao, ZHANG Jian-guo

(*Inst. of Food Sci. & Engin.*, *Schl. of Med. Inst. & Food Engin.*, *Uni. of Shanghai for Sci. & Technol.*, *Shanghai* 200093)

Abstract *Komagataella phaffii*, as an important host for heterologous protein expression is very necessary to improve for its secretory capacity of heterologous protein. Recently, many scholars have reported heterologous protein secretory related genes and proteins from *K. phaffii*. And the announcement of *K. phaffii* genome sequence has promoted the progress of the studies in this aspect. This article summarizes the genes and proteins related to protein secretory pathway according to the steps of protein secretory, and benefits to analyze the concrete steps for controlling the secretion effects of the protein, in order to establish a more effective expression system of *K. phaffii* provide a foundation.

Keywords *Komagataella phaffii*; heterologous protein; secretory pathway; molecular companion; protein transport

随着现代分子生物学的飞速发展，利用工业微生物作为表达系统获得重组蛋白已经成为研究蛋白质结构和功能、制备抗体、疫苗、工业用酶及药用蛋白的重要途径[1]。目前研究比较深入的重组蛋白表达系统有大肠埃希菌表达系统、枯草芽胞杆菌表达系统、链霉菌表达系统、毕赤酵母表达系统、酿酒酵母表达系统、昆虫表达系统、哺乳动物表达系统和植物表达系统等[2]，其中毕赤酵母（*Komagataella phaffii*）是一种应用较为广泛的真核表达系统，目前已成功表达1 000多种外源蛋白[3]，其中70多种外源蛋白已经商业化生产。外源蛋白表达量高是毕赤酵母表达系统的特点之一，羟基腈裂解酶在毕赤酵母胞内表达可达22 g/L[4]，胶原蛋白利用毕赤酵母分泌表达可达15 g/L[5]。毕赤酵母的人源化改造消除了重组蛋白的免疫原性[6]。但毕赤酵母表达不同外源蛋白的表达量差异较大[7]，所以，阐明外源蛋白分泌途径的相关基因和蛋白质及其功能将为改造外源蛋白分泌途径，提高外源蛋白产量奠定基础[8]。近年来，毕赤酵母基因组序列的公布，转录组学和蛋白质组学分析技术的发展，使得阐明外源蛋白分泌过程中相关基因和蛋白质成为可能。利用Gene-Bank数据库、KEGG生物信息数据库以及两个基因组（酵母菌属基因组数据库 *Saccharomyces* ge-

基金项目：国家自然科学基金面上项目（31870045，41601315）

作者简介：刘冰 女，硕士研究生。研究方向为微生物工程。E-mail:987425587@qq.com

* 通讯作者。男，副教授。研究方向为微生物工程。E-mail:jgzhang@usst.edu.cn

收稿日期：2018-10-10

nome database,SGD[9]和酵母的 ORCAE 系统[10])对蛋白分泌过程进行分析,总结了毕赤酵母分泌外源蛋白途径中涉及的基因和蛋白质,阐明一个较为完整的外源蛋白分泌途径。为从分子水平寻找外源蛋白调控的新靶点,提高外源蛋白表达量提供参考。

1 概 述

目前研究相对较深入的蛋白质分泌途径有 Sec 分泌途径、双精氨酸途径(Tat)和信号识别颗粒转运途径。毕赤酵母表达系统将蛋白质分泌到胞外主要依靠信号识别颗粒介导转运的经典途径,又称为内质网-高尔基体(ER-Golgi)蛋白分泌途径(图 1)。这个途径中目的基因转录成 mRNA 后,在细胞质中核糖体上合成新生肽链;再通过内质网膜上的蛋白通道转运至内质网腔中进行折叠和修饰;然后被运送到高尔基体中进一步加工修饰,形成特定结构并具有功能的蛋白质;最后通过高尔基体的分泌小泡与质膜融合的方式将蛋白质分泌到细胞外[11]。

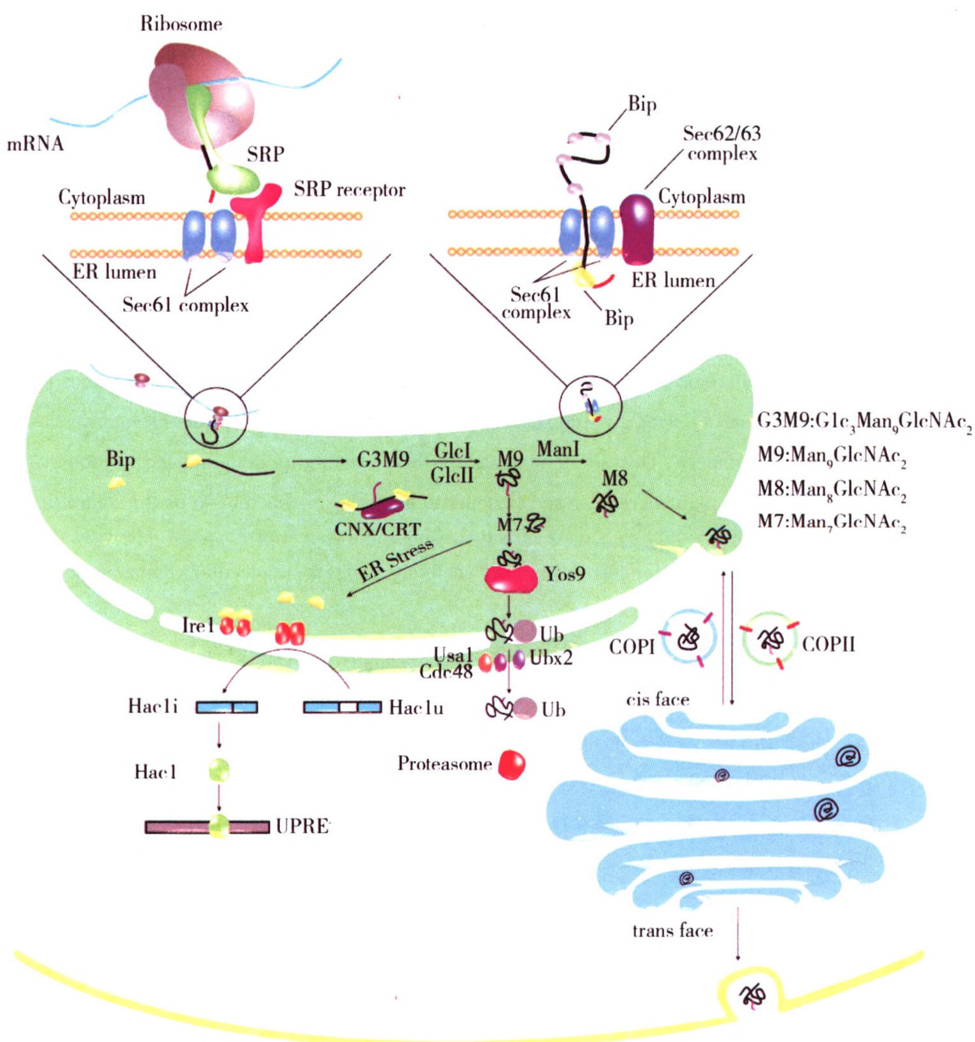

图 1 毕赤酵母的蛋白质分泌途径

Fig. 1 Secretory pathway of protein from *K. phaffii*

2 新生肽链跨膜靶向内质网

根据 mRNA 翻译与新生肽链跨膜过程是否同时发生将新生肽链跨膜靶向内质网腔的过程分为“翻译共转运”和“翻译后转运”两种方式[12]。

2.1 翻译共转运(Co-translational translocation)

新生肽链边合成边转入内质网腔的方式称为翻译共转运。当新生肽链的 N 端信号肽(Signal peptide,SP)刚在核糖体中合成,即形成核糖体新生肽链复合物(Ribosome-nascent chain complex,RNC),随即信号识别颗粒(Signal recognition particle,SRP)通过疏水相互作用与 N 端信号肽结合[13-14],导致新生肽链在核糖体的翻译过程暂停;随后信号识别颗粒牵引着核糖体新生肽链复合物与内质网上的信号识别颗粒受体(SRP receptor,SR)结合,然后翻译过程又重新启动,同时信号识别颗粒被释放到细胞质中,重新结合其他新合成的信号肽,进行新一轮的转运[15]。内质网上存在一个由 Sec61 复合体和膜蛋白组成的疏水跨膜通道[16],新生肽链被信号肽牵引着由此通道进入内质网腔[17]。接着信号肽被膜内的信号肽酶及其他蛋白酶降解,而新生肽链则继续延伸直至翻译完毕。

2.1.1 信号肽　信号肽是新生肽链中一段特殊的氨基酸链,由 10 ~ 40 个氨基酸残基组成,可引导蛋白跨膜或分泌到胞外。信号肽大多位于新生肽链的 N 端,偶尔也有位于新生肽链的中部。不同蛋白质的信号肽序列各不相同,但它们的结构域可分为亲水区、疏水区、加工区。亲水区一般位于新生肽链中富含碱性氨基酸的 N 端。它提供正电荷,可与信号识别颗粒中带负电的酸性氨基酸残基形成静电相互作用,带电荷区域还在新生肽段转移过程中起重要作用[18]。疏水区一般为 8 ~ 12 个疏水性氨基酸残基组成的 α 螺旋结构[19],也是 SRP 和新生肽链相互识别和结合的关键区域。酵母 SRP 有 SRP9、SRP14、SRP19、SRP54、SRP68、SRP72 等亚基和一个 7S RNA。SRP54 亚基的 C 段(M 结构域)和疏水区结合[20]。加工区是 C 末端一段富含负电荷、小分子氨基酸残基的氨基酸链,也是信号肽酶切割的部位[21]。在新生肽链中,除 N 端有信号肽外,C 端部分肽段也对肽链穿越粗面内质网膜起作用。例如 C 端肽段能终止肽链穿越,因此该部分肽段被称为终止转运序列,在某种意义上也是一种信号肽[7]。迄今为止,在毕赤酵母中成功实现外源蛋白分泌表达的信号肽主要有酿酒酵母 α 交配因子前导肽(Mating factor,α-MF)、酿酒酵母蔗糖转化酶信号肽(Sucrase2,SUC2)、毕赤酵母酸性磷酸酶信号肽(Phosphatase1,PHO1)、外源蛋白自身信号肽[22]。目前毕赤酵母分泌表达的诸多外源蛋白报道中,α-MF、SUC2、PHO1 作为信号肽的分泌蛋白最高产量分别为 22.0 g/L 羟基腈裂解酶[4]、2.5 g/L 淀粉酶[23]、2.3 g/L 过氧化氢酶[24]。以脂肪酶自身信号肽(nSB)在毕赤酵母中分泌表达脂肪酶的产量为 383 U/mL[25]。α-MF 分泌最高的外源蛋白产量可能与 α-MF 引导外源蛋白至高尔基体或小囊泡的效率,或者与蛋白质折叠和二硫键形成有关[26]。

2.1.2 SRP 及其受体　1980 年 Walter 等[27]首次分离得到 SRP 后证实其为核糖核酸蛋白复合物。敲除 SRP 的组成部分不会抑制新生肽链的合成,但是阻碍了新生肽链在内质网膜上的组装[28]。这说明 SRP 的功能为引导多肽至内质网膜。SRP 在细菌、古菌、真核生物的细胞质中都存在[29]。细菌 SRP 由 1 条 SRP RNA(4.5S RNA)和 1 条多肽链(SRP54)组成;古菌 SRP 由 1 条 SRP RNA(7S RNA)和两条多肽链(SRP19 和 SRP54)组成;真核生物(哺乳动物和酵母)SRP 都是由 1 条 SRP RNA(7SL RNA 或 7S RNA)和 6 条分子质量分别为 9、14、19、54、68 和 72 kDa 的多肽链(SRP9、SRP14、SRP19、SRP54、SRP68 和 SRP72)组成。哺乳动物的 SRP54 是 1 条约含 500 个氨基酸残基的多肽链。这条多肽链由 3 个结构域组成:N 端的 N 结构域,含 GTP 结合位点的 G 结构域,C 端富含甲硫氨酸的 M 结构域[30]。M 结构域可以形成一个疏水沟槽,通过槽底部的结构与信号肽序列结合[31]。SRP 的 RNA 调节 SRP 与核糖体以及与 SR 的结合,并为 SRP 亚基组装充当骨架[32]。哺乳动物 SR 是位于内质网膜上的二聚体,由 1 条 α 链(α-SR)和 1 条 β(β-SR)链组成。α-SR 含有 N 结构域和 G 结构域。α-SR 的 G 结构域与 GTP 结合,且 N、G 结构域与 SRP54 的 N、G 结构域结合。β-SR 主要负责 SRP 与内质网的结合并转运新生肽链[33]。SRP 与 SR 的 N

结构域通过静电相互作用而识别。GTP水解导致SRP与SR解离。目前在多种酵母菌,例如酿酒酵母[34]、粟酒裂殖酵母[35]、解脂耶氏酵母[36]中都已鉴定出SRP54。但是假丝酵母属、多形汉逊酵母、毕赤酵母中都还没有鉴定出SRP54[37]。

2.1.3 跨膜通道 新生肽链利用内质网的疏水跨膜通道进入内质网腔。疏水跨膜通道由Sec61复合体和转运相关蛋白(Translocon associated protein,TRAP)组成[16]。Sec61复合体的3个亚基(α、β、γ)形成一个疏水通道。TRAP是一个含有4个跨膜亚基的信号肽受体蛋白。TRAP与信号肽的相互作用调控转运通道[17]。TRAP还可以与错误折叠的新生肽链结合,将错误折叠的新生肽链从内质网逆向运输至细胞质中降解[38]。疏水作用在信号肽引导新生肽链进入内质网腔,信号肽和信号识别颗粒的结合,以及新生肽链穿过内质网疏水通道三个环节中都发挥重要作用[39]。信号肽疏水区有利于新生多肽的分泌。Zhang等[40]将信号肽突变为更加疏水的序列提高了胰蛋白酶的分泌量。信号肽序列和新生多肽之间的识别并没有严格的专一性[41],所以通过设计信号肽,增强疏水性也是一种提高新生多肽分泌效率的途径。

2.2 翻译后转运(Post-translational translocation)

新生肽链在细胞质中核糖体上合成完毕后,再进行跨膜转运的方式称为翻译后转运。酵母菌SRP和SR的基因突变不会造成细胞死亡,说明酵母菌还存在另外的蛋白质分泌途径。毕赤酵母表达外源蛋白也能以"翻译后转运"的方式分泌[22]。采用翻译后转运的方式是由于信号肽的疏水性较弱而逃脱了SRP的识别[42]。新生肽链翻译后,被分子伴侣(Molecular chaperone)识别后形成一定的非折叠或松散折叠的中间构象,再由信号肽牵引至内质网的疏水跨膜通道进入内质网腔[43]。内质网腔中ATP偶联的结合蛋白(binding protein,Bip)利用ATP水解提供的能量与新生肽链结合。信号肽在新生肽链进入内质网腔过程中被信号肽酶切掉。Ssa1~Ssa4(属于Hsp70家族)是毕赤酵母中4个高度同源的分子伴侣。其功能相当于大肠埃希菌的Dnak。Ssa的缺失导致新生肽链不能进入内质网而在细胞质中积累。毕赤酵母的另一种分子伴侣Ydj1(属于Hsp40家族)相当于大肠埃希菌的Dnaj。Ydj1和Ssa的协同作用促进新生肽链在细胞质中保持正确的状态,有利于顺利进入内质网进行折叠[43]。分子伴侣维持新生多肽的构象,避免新生多肽的疏水基团相互靠近形成聚体而被降解,提高了折叠效率和跨膜转运效率。所以过表达分子伴侣可促进蛋白质的分泌[42]。

3 内质网中折叠与修饰

内质网的主要功能是对多肽链进行折叠与修饰,如二硫键(Disulfide bond)的形成、糖基化(Glycosylation)、羟基化(Hydroxylation)、酰基化(Acylation)。这些修饰对于新生肽链形成正确的构象非常关键。

内质网中帮助新生肽链折叠的蛋白质有两类。一类是分子伴侣;另一类是催化新生肽链折叠的折叠酶。已知的折叠酶有催化异构反应的蛋白二硫键异构酶(Protein disulfide isomerase,PDI)、肽基脯氨酰顺反异构酶(PPI)两种[44]。而PDI不仅是糖蛋白成熟过程的折叠酶,同时也起分子伴侣的作用[42]。新生肽链在折叠酶的作用下与Bip和钙联蛋白(Calnexin/calreticulin)结合而折叠成正确构象[42]。目前已经证实在内质网腔中与新生肽链的疏水区域结合,而促进分泌效率的分子伴侣有Bip、PDI、Sec63、Ydj1、Ssa1等[21]。Li等[45]共表达Bip将皱褶假丝酵母脂肪酶提高了1.18倍。Sha等[46]通过共表达PDI将脂肪酶的产量提高了2.74倍。Kar2p、Ssa1p、PDI将粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)的表达量提高4~7倍。而且伴侣蛋白的组合对外源蛋白表达量的提高有协同作用,共表达YDJ1p/PDI、YDJ1p/Sec63、Kar2p/PDI将G-CSF的表达量分别提高8.7、7.6、6.5倍[47]。毕赤酵母对新生肽链的修饰还有去除起始甲硫氨酸、N-乙酰化、C-甲基化、和豆蔻酰化等。这些修饰有利于避免外源蛋白的免疫原性,也对膜蛋白的表达有帮助[48]。

糖基化也是毕赤酵母对新生肽链常见的修饰方式。糖基化伴随着多肽链的合成同时进行。根据糖与氨基酸残基的连接类型分为O-糖基化和N-糖基化。O-糖基化由O-糖基化转移酶(PMT)催化将糖连接到丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)的羟基上。PMT是一种以二聚体形式发挥作用

的跨膜蛋白。毕赤酵母有 5 个 *pmt* 基因。PMT 利用磷酸醇介导将 1 个甘露糖转移到苏氨酸、丝氨酸等残基上。甘露糖转移酶进一步在甘露糖上增加 4 个以上的甘露糖分子，最终形成 Man-α、1-2 (1-4) -Ser/Thr 型的 O-糖链[49]。但是目前还无法准确预测 O-糖基化的位点。N-糖基化是将糖链连接到新生肽链的天冬酰胺-X-丝氨酸/苏氨酸 (Asn-X-Ser/Thr, X 为除脯氨酸以外的任何一种氨基酸) 三联体的天冬酰胺上。N-糖基化过程首先是葡萄糖、甘露糖、半乳糖、N-乙酰氨基葡萄糖与磷酸多萜醇形成一个脂多糖前体($Glu_3Man_9GluNAc_2$)。然后，N-糖基转移酶将该前体的多糖链部分转运至新生肽链中 Asn-X-Ser/Thr 三联体的 Asn 残基上。随后新生肽链经过葡萄糖苷酶 I 和 II 切除多糖链的 3 个葡萄糖残基，并且经过甘露糖苷酶 I 切除 1 个甘露糖后，形成 $GluMan_8NAc_2$ 结构[50]。这两种糖基化修饰步骤和新生肽链招募分子伴侣和折叠酶同步进行得到折叠与修饰后的糖蛋白。最后，糖蛋白以囊泡形式转运到高尔基体。进而，在 α-1,6-甘露糖基转移酶(OCH)和 α-1,3-甘露糖基转移酶(MNN)的作用下添加 α-1,6-甘露糖和 α-1,3-甘露糖。其他的甘露糖转移酶和磷酸甘露糖转移酶继续特异地识别此糖链，并添加甘露糖和磷酸甘露糖，形成高甘露糖结构[51]。酿酒酵母的寡糖转移酶复合物 (Oligosaccharyltransferase complex, OST) 包括 Ost1p、Ost2p、Ost3p、Ost4p、Ost5p、Ost6p、Stt3p、Swp1p、Wbp1p 共 9 个亚基，催化 N-糖基化反应。其中 Ost3p、Ost4p 和 Stt3p 形成的复合物直接参与靶肽识别。毕赤酵母的 Stt3p 与酿酒酵母 Stt3p 有 65% 的同源性[52]。

与酿酒酵母相比，毕赤酵母表达外源蛋白的糖基化程度有所减轻，但与天然蛋白质相比，仍然存在着过度糖基化的问题。过度糖基化会使蛋白产物相对分子质量不均一，蛋白质的功能位点被掩盖。因此对毕赤酵母糖基化过程改造非常必要。目前毕赤酵母糖基化改造方法有通过抑制 OCH1 酶活性消除内源性高甘露糖；引入 α-1,2-糖苷甘露糖苷酶 I 降解高甘露糖；引入类似于哺乳动物的唾液酸化复杂聚糖成分[53]。

新生肽链在内质网腔进行折叠和修饰后应该进入高尔基体进行再加工。外源蛋白过量表达会占用大量的分子伴侣等辅助因子。在葡萄糖饥饿等胁迫条件下，有的新生肽链会因为缺乏分子伴侣而无法正确折叠，内质网内会积累大量未折叠和折叠错误的蛋白质，引发内质网应激反应(Endoplasmic reticulum stress, ERS)。这些未折叠或错误折叠会被保留在内质网中继续折叠或被运转到细胞质中降解[54]。细胞主要通过未折叠蛋白反应(Unfolded protein response, UPR)[55]和内质网相关蛋白降解(Endoplasmic reticulum associated degradation, ERAD)途径[56]来调控内质网压力。如果内质网长时间保持 ERS 状态，细胞会启动凋亡程序。

UPR 是内质网应激条件下激活的主要信号通路之一，通过一系列信号转导反应上调分子伴侣和折叠酶的表达量来提高内质网的折叠能力。内质网膜上有 3 种跨膜蛋白可以感知未正确折叠新生肽链，分别为 Ire1p、Hac1p、Rlg1p。当大量未正确折叠新生肽链存在时，Ire1 上的 Bip/Kar2 解离后暴露了 Ire1 的二聚体结合位点，Ire1 形成二聚体而导致自身磷酸化[57]。磷酸化后的 Ire1 二聚体能特异地剪切细胞质中的 hac1 mRNA (hac1u)内含子。剪切后的 hac1 mRNA(hac1i)由 Rlg1p 连接后翻译成具有活性的转录因子 Hac1。Hac1 结合染色体的 UPR 元件上调 UPR 相关基因。这些 UPR 相关基因主要编码内质网的分子伴侣和折叠酶类，如 Bip/Kar2、二硫键异构酶 PDI 和凝集素类蛋白 CNX/CRT 等[58]。

ERAD 是广泛存在于酵母和哺乳动物的降解未正确折叠新生肽链的途径。当未正确折叠新生肽链与 Hsp70 长时间结合就会被 E3 泛素连接酶 Hrd1 复合物识别。新生肽链糖基化错误而带有 $Man_7GlcNAc_2$ 糖链时，会被凝集素类蛋白 Yos9 的腔结构域识别。被识别的新生肽链在 E 泛素激活酶(Uba1)、E2 泛素结合酶(Ubc6/Ubc7)、E3 泛素连接酶(Hrd1/Doa10)的作用下将泛素结合到新生肽链中赖氨酸残基的 ε 氨基上。经泛素化的新生肽链在 Usa1、Ubx2 和 Cdc48 等因子作用下逆向运出内质网后，被细胞质中蛋白酶体降解，然后用于合成新的蛋白质[58]。

4　高尔基体加工和运输

高尔基体主要对新生肽链进行分类转运、糖

链改造。带寡糖链的新生肽链还需要在高尔基体中加工才能成为有活性的外源蛋白。细胞中大量的高尔基堆成具有多个扁平囊泡后,以囊泡穿梭和囊泡成熟2种方式转运外源蛋白。囊泡穿梭是基于扁平囊泡内存在一套特殊的蛋白加工系统。外源蛋白在囊泡中沿着高尔基堆穿梭而成为有活性的外源蛋白。囊泡成熟方式认为囊泡沿着高尔基由顺面向反面移动,再将外源蛋白从反面扁平囊泡运回[59-60]。高尔基体通过出芽的方式形成小泡将外源蛋白运输到细胞膜附近,然后与质膜融合使分泌小泡内的外源蛋白释放到胞外。

外源蛋白分泌有被膜小泡 COP I (Coat protein complex I)、被膜小泡 COP Ⅱ (Coat protein complex II)和网格蛋白(Calthrin)介导3种方式。COP I 的作用为介导外源蛋白从高尔基体反面分泌到顺面,介导从内质网到高尔基体的顺行转运,以及从高尔基体到内质网的逆向运输,将逃逸蛋白回收到正确位置[61]。被膜小泡 COPII 是由5个高度保守蛋白(小 G 蛋白 Sar1、内衣被蛋白 Sec23 和 Sec24、外衣被蛋白 Sec13 和 Sec31)组成的基本单位形成[62]。COPII 小泡主要介导蛋白从内质网到高尔基体的顺向运输。网格蛋白产生于高尔基体,介导外源蛋白从高尔基体到细胞膜的运输。这三种小泡都需要 GTP 结合蛋白(Sar 与 ARF)的协助才能完成运输。小泡到细胞膜的过程借助于细胞骨架完成蛋白识别、装配、去装配等步骤的调控[63]。小泡与质膜的融合主要由 SNARE 蛋白(Soluble n-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)介导。小泡上的 v-SNARE 蛋白识别质膜上的 t-SNARE 后,形成 SNARE 复合体,达到定位的作用。最后,小泡和质膜融合将外源蛋白释放到胞外[64]。

5 展 望

改造毕赤酵母的外源蛋白分泌途径是研究热点。随着毕赤酵母基因组序列的公布,从整体视角考虑各种限制因素,有利于对外源蛋白分泌的分子机制研究[65]。目前已有改造分泌途径的蛋白而提高外源蛋白的产量的研究成果。例如共表达内质网膜的跨膜蛋白 Hac1p 分别提高白介素-10 和唾液酸酶达2.2倍和2.1倍[66]。Vanz 等[67]优化培养过程降低 UPR 和 ERAD 途径的相关蛋白,将胰岛素原的表达量大幅度提高。Wang 等[68]优化氮源流加降低 UPR 和 ERAD 途径相关蛋白使肽链内切酶的表达量提高1.48倍。本文总结毕赤酵母外源蛋白分泌途径中涉及的基因和蛋白,介绍了其功能,为进一步调控外源蛋白分泌提供基础。在毕赤酵母的5 000多个基因中,已知可能参与外源蛋白分泌的约有400多个,但仍然难以达到对蛋白分泌的控制[42],因此需要进一步挖掘影响外源蛋白分泌的关键基因和蛋白。例如,毕赤酵母中仍有很多基因还没鉴定,所以鉴定毕赤酵母基因,表征其蛋白的功能是完善蛋白分泌途径不可或缺的工作。而且,外源蛋白的分泌是一个动态的生物化学过程。其中影响基因转录和翻译的各种因素相互作用,形成调控蛋白表达的动态网络,也是调控外源蛋白分泌的难点。毕赤酵母表达外源蛋白的机制为底物依赖性,培养条件的变化也会引起毕赤酵母代谢途径的改变。这些改变也涉及到基因转录和翻译的变化。所以进一步阐明毕赤酵母的外源蛋白分泌途径和机制还有很多工作需要开展。

参考文献:

[1] 李新丽,黄瑾. 表达外源蛋白的有利工具——毕赤酵母表达系统[J]. 现代生物医学进展,2009,9(1):171-174.

[2] 蔡海莺,李杨,张辉,等. 基因设计对重组蛋白表达的影响研究进展[J]. 生物工程学报,2013,29(9):1201-1213.

[3] Damsceno LM, Hyang C, JR., Batt CA. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(1): 31-39.

[4] Hasslacher M, Schall M, Hayn M, et al. High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree Hevea brasiliensis in microbial hosts[J]. Protein Expression and Purification, 1997, 11(1): 61-71.

[5] Werten MWT, Van den bosch TJ, Wind RD, et al. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*[J]. Yeast, 1999, 15(11): 1087-1096.

[6] Hamlton SR, Davidson RC, Sethuraman N, et al. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins[J]. Science, 2006, 313(5792): 1441-1443.

[7] 张树军,杨磊,黄瑾. 信号肽序列在酵母分泌表达系统中的应用[J]. 医学综述,2007,13(9):643-645.

[8] 朱泰承,李寅. 毕赤酵母表达系统发展概况及趋势[J]. 生物工程学报,2015,31(6):929-938.

[9] Costanzo MC, Engel SR, Wong ED, et al. *Saccharomyces* genome database provides new regulation data[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42: D717-D725.

[10] Mattanovich D, Callewaert N, Rouae P, et al. Open access to sequence: Browsing the *Pichia pastoris* genome[J]. Microbial Cell Factories, 2009, 8: 53.

[11] Lee MCS, Moller EA, Goldberg J, et al. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2004, 20(1): 87-123.

[12] Rapopprt TA. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes[J]. Nature, 2007, 450(7170): 663-669.

[13] 崔艳艳, 张士彬, 谢能中, 等. 信号识别颗粒调控蛋白转运系统[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1358-1365.

[14] Beckwith J. The Sec-dependent pathway[J]. Research in Microbiology, 1900, 164(6): 497-504.

[15] 陆忠华. 内质网的蛋白质合成功能[J]. 生物学教学, 2016, 41(2): 75.

[16] Halic M, Beckmann R. The signal recognition particle and its interactions during protein targeting[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2005, 15(1): 116-125.

[17] 吴涛, 张耀洲. 内质网膜上的转运使者-易位子相关蛋白(TRAP)[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(2): 95-100.

[18] Nilsson I, Lara P, Hessa T, et al. The code for directing proteins for translocation across ER membrane: SRP cotranslationally recognizes specific features of a signal sequence[J]. Journal of Molecular Biology, 2015, 427(6): 1191-1201.

[19] Akopiand D, Dalal K, Shen K, et al. SecYEG activates GTPases to drive the completion of cotranslational protein targeting[J]. Journal of Cell Biology, 2013, 200(4): 397-405.

[20] Zopf D, Bernstein HD, Johnson AE, et al. The methionine-rich domain of the 54 kd protein subunit of the signal recognition particle contains an RNA binding site and can be crosslinked to a signal sequence[J]. The EMBO Journal, 1990, 9(13): 4511-4517.

[21] Hainal T, Huang S, Meriläinen G, et al. Structural basis of signal-sequence recognition by the signal recognition particle[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2011, 18(3): 389-391.

[22] 张勇, 毛若雨, 胡小媛, 等. 信号肽与分泌通路在毕赤酵母表达异源蛋白中的作用机制[J]. 中国饲料, 2013, 1: 13-17.

[23] Paiger E, Margolles E, Cermata J, et al. Efficient expression and secretion of recombinant alpha amylase in *Pichia pastoris* using two different signal sequences[J]. Yeast, 1994, 10(11): 1415-1419.

[24] Calera JA, Paris S, Monod M, et al. Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*[J]. Infection and Immunity, 1997, 65(11): 4718-4724.

[25] Vadhana AKP, Samuel P, BERIN R M, et al. Improved secretion of Candida antarctica lipase B with its native signal peptide in *Pichia pastoris*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2013, 52(3): 177-183.

[26] Murasugi A, Tohma-aiba Y. Comparison of three signals for secretory expression of recombinant human midkine in *Pichia pastoris*[J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 2001, 65(10): 2291-2293.

[27] Walter P, Blobel G. Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1980, 77(12): 7112-7116.

[28] Yosef I. Membrane protein biogenesis in Ffh- or FtsY-depleted *Escherichia coli*[J]. Plos One, 2010, 5(2): e9130.

[29] Plagens A, Daume M, Wiegel J, et al. Circularization restores signal recognition particle RNA functionality in *Thermoproteus*[J]. Elife, 2015, 4: e11623.

[30] Walter P, Johnson AE. Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane[J]. Annual Review of Cell Biology, 1994, 10(1): 87-119.

[31] Halic M, Benker T, Pool MR, et al. Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome[J]. Nature, 2004, 427(6977): 808-814.

[32] Wild K, Sinning I. RNA gymnastics in mammalian signal recognition particle assembly[J]. Rna Biology, 2014, 11(11): 1330-1334.

[33] Dobberstein B. Secretory protein translocation across membranes-the role of the "docking protein"[J]. Nature, 1982, 297(5868): 647-750.

[34] Delic M, Vallil M, Graf AB, et al. The secretory pathway: exploring yeast diversity[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(6): 872-914.

[35] Slinger D, Bbernnwald P, Liao X, et al. Identification of RNA sequences and structural elements required for assembly of fission yeast SRP54 protein with signal recognition particle RNA[J]. Molecular & Cellular Biology, 1993, 13(3): 1353-1362.

[36] Leeil H, Ogrydaiak DM. *Yarrowia lipolytica* SRP54 Homolog and Translocation of Kar2p[J]. Yeast, 1997, 13(6): 499-513.

[37] Keenan RJ, Freymann DM, Stroud RM, et al. The signal recognition particle[J]. Annurevbiochem, 2001, 70(1): 755-75.

[38] Nagasawa K, Higashi T, Hosokawa N, et al. Simultaneous induction of the four subunits of the TRAP complex by ER stress accelerates ER degradation[J]. EMBO Reports, 2007, 8(5): 483-489.

[39] Batey RT, Sagar MB, Doudna JA. Structural and energetic analysis of RNA recognition by a universally conserved protein from the signal recognition particle[J]. Journal of Molecular Biology, 2001, 307(1): 229-246.

[40] Zhang Y, Huang H, Yao X, et al. High-yield secretory pro-

duction of stable, active trypsin through engineering of the N-terminal peptide and self-degradation sites in *Pichia pastoris* [J]. Bioresour Technol, 2017, 247: 81-87.

[41] Yang Z, Zhang Z. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review [J]. Biotechnology Advances, 2018, 36(1): 182-195.

[42] 常亮, 刘晓志, 孟雅娟, 等. 酵母分泌系统工程化改造研究进展[J]. 生物技术进展, 2013, 3: 185-189.

[43] 张伟, 刘志敏, 陈惠鹏. 酵母蛋白分泌途径的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(1): 81-83.

[44] 王志珍. 蛋白质折叠和分子伴侣[J]. 生物学通报, 2004, 39(5): 1-6.

[45] Li X, Liu Z, Wang G, et al. Overexpression of *Candida rugosa* lipase Lip1 via combined strategies in *Pichia pastoris* [J]. Enzyme & Microbial Technology, 2016, 82: 115-124.

[46] Sha C, Yu XW, Lin NX, et al. Enhancement of lipase r27RCL production in *Pichia pastoris* by regulating gene dosage and co-expression with chaperone protein disulfide isomerase [J]. Enzyme & Microbial Technology, 2013, 53(6-7): 438-443.

[47] Zhang W, Zhao HL, Xue C, et al. Enhanced secretion of heterologous proteins in *Pichia pastoris* following overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* chaperone proteins[J]. Biotechnology Progress, 2006, 22(4): 1090-1095.

[48] 胡世界, 罗素兰, 张吉贞, 等. 巴斯德毕赤酵母表达系统及其高水平表达策略[J]. 生物技术, 2007, 17(6): 78-83.

[49] 毛银平. 毕赤酵母表达系统糖基化修饰改造研究[D]. 合肥:安徽大学, 2015.

[50] Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production [J]. Journal of Molecular Recognition, 2005, 18(2): 119-138.

[51] 杨婕. 毕赤酵母表达外源蛋白糖基化研究进展[J]. 福建畜牧兽医, 2014, 2: 20-22.

[52] Chol B-K, Warburton S, Lin H, et al. Improvement of N-glycan site occupancy of therapeutic glycoproteins produced in *Pichia pastoris*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(3): 671-82.

[53] 傅小蒙, 孔令聪, 裴志花, 等. 毕赤酵母表达系统优化策略概述[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(10): 86-90.

[54] Travers KJ, PatilL CK, Wodicka L, et al. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation [J]. Cell, 2000, 101(3): 249-258.

[55] Zhu T, Guo M, Zhuang Y, et al. Understanding the effect of foreign gene dosage on the physiology of *Pichia pastoris* by transcriptional analysis of key genes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(4): 1127-1135.

[56] Bernasconi R, Molinari M. ERAD and ERAD tuning: disposal of cargo and of ERAD regulators from the mammalian ER[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2011, 23(2): 176-183.

[57] Van AE, Braakman I. Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory[J]. Critical Reviews in Biochemistry & Molecular Biology, 2005, 40(4): 191-228.

[58] 闫孟节, 侯运华, 吕珊珊, 等. 内质网压力响应相关的蛋白质降解[J]. 生物化学与生物物理进展, 2016, 43(6): 539-549.

[59] Mironov AA, Beznoussenko GV, Nicoaiani P, et al. Small cargo proteins and large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae[J]. Journal of Cell Biology, 2001, 155(7): 1225-1238.

[60] Martineamenrguez JA, Prekeris R, Oorschot V, et al. Peri-Golgi vesicles contain retrograde but not anterograde proteins consistent with the cisternal progression model of intra-Golgi transport[J]. Journal of Cell Biology, 2001, 155(7): 1213-1224.

[61] Lanoix J, Ouwendijk J, Stark A, et al. Sorting of Golgi resident proteins into different subpopulations of COPI vesicles a role for ArfGAP1[J]. Journal of Cell Biology, 2001, 155(7): 1199-1212.

[62] 徐晓峰, 普雪娇, 莫蓓莘. COPII 各组分在蛋白质分泌途径中的功能[J]. 生命科学, 2016,(4): 442-451.

[63] 周娜娜, 王禄山, 公维丽, 等. 丝状真菌胞外蛋白高效分泌机制的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2016, 1: 44-54.

[64] 孔云, 张海龙, 赵潇男, 等. COG 拴留复合体对高尔基体功能的重要性[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 3: 1096-1106.

[65] 王冶, 郑甲, 唐诗哲, 等. 外源蛋白在巴斯德毕赤酵母中高效分泌表达的前沿技术[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(3): 689-694.

[66] Guergal M, Ruckaert S, Jacobs PP, et al. The HAC1 gene from *Pichia pastoris*: characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins [J]. Microbial Cell Factories, 2010, 9(1): 49.

[67] Vanz AL, Nimta M, Rinas U. Decrease of UPR- and ERAD-related proteins in *Pichia pastoris* during methanol-induced secretory insulin precursor production in controlled fed-batch cultures[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 23.

[68] Wang XD, Jiang T, Yu XW, et al. Effects of UPR and ERAD pathway on the prolyl endopeptidase production in *Pichia pastoris* by controlling of nitrogen source[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2017, 44(7): 1053-1063.