

· 综 述 ·

多二硫键蛋白在大肠杆菌中的表达研究

王彦婷, 黄智刚, 郭西英, 汪 盛*

(华中科技大学 生命科学与技术学院 分子生物物理教育部重点实验室, 中国湖北 武汉 430074)

摘 要: 真核生物的许多蛋白富含二硫键。由于大肠杆菌细胞质中含有二硫键还原酶, 利用大肠杆菌生产具有生物活性的重组二硫键蛋白充满挑战。近年来, SHuffle 菌株、超氧化性细胞的相继问世, 利用分子伴侣或引入二硫键从头形成体系, 使多二硫键蛋白在大肠杆菌中的表达成为可能。简要概述了野生型大肠杆菌细胞周质和经遗传改造的工程菌细胞质中二硫键的形成机制, 并着重介绍了近年来重组二硫键蛋白表达策略的最新研究进展, 对利用大肠杆菌反应器生产富含二硫键蛋白起指导意义。

关键词: 二硫键蛋白; 大肠杆菌; Dsb 蛋白; 分子伴侣; 巯基氧化酶; 超氧化性细胞

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2015)03-0258-07

Research on the Expression of Proteins with Multiple Disulfide Bonds in *E. coli*

WANG Yan-ting, HUANG Zhi-gang, GUO Xi-ying, WANG Sheng*

(Key Laboratory of Molecular Biophysics of the Ministry of Education, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, Hubei, China)

Abstract: A large number of proteins in eukaryotes are rich in disulfide bonds. Since the cells have enzymes dedicated to reducing disulfide bonds in their cytoplasm, production of soluble and active disulfide-bonded proteins in *E. coli* is a challenge. Recently, SHuffle strain and superoxidizing cells have been successfully developed; molecular chaperones have been applied in prokaryotic expression system; and the *de novo* disulfide bond formation system has been introduced in the cytoplasm of *E. coli*. These developments made it possible to express proteins with multiple disulfide bonds in *E. coli*. The mechanisms responsible for disulfide bond formation in *E. coli*, both in its native periplasm of wild-type strains and in the genetically modified cytoplasm of engineered strains are summarized briefly. Advances of expressing recombinant disulfide bonded proteins in *E. coli* are highlighted. It may be important for producing recombinant proteins with multiple disulfide bonds in *E. coli* as a microbial cell factory.

Key words: disulfide bond protein; *E. coli*; Dsb protein; molecular chaperone; sulfhydryl oxidase; superoxidizing cells

(*Life Science Research*, 2015, 19(3): 258~264)

蛋白质在细胞的各种生命活动中扮演了重要的角色, 如信号传导、免疫应答、细胞粘附等。20 世纪 70 年代, DNA 重组技术的应用, 使蛋白质能在多种宿主细胞中表达^[1]。总体上, 高产率重组蛋白的获得比较困难且不可预计, 尤其是目标蛋白

存在翻译后修饰, 如形成二硫键。真核生物内的二硫键蛋白普遍存在, 对人类基因组的预测表明, 大约 30% 的蛋白定位于内质网, 而其中一半数量含有二硫键^[2]。二硫键可在构象上固定多肽链的骨架或改善其热动力学稳定性, 以抵抗高温、强酸、

收稿日期: 2014-07-31; 修回日期: 2014-10-23

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2010CB529804); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2014TS087)

作者简介: 王彦婷(1986-), 女, 重庆人, 博士研究生, 主要从事膜蛋白表达、纯化及结构研究; * 通讯作者: 汪盛(1972-), 男, 四川南充人, 副教授, 博士, 主要从事结构生物学与计算机辅助药物筛选相关研究, Tel: 027-87793053, E-mail: shengwang@hust.edu.cn.

强碱等伤害。因此,二硫键蛋白常被分泌到细胞外或锚定于细胞膜,它们适于作为治疗药物(如胰岛素、抗体)或制药产业的靶标蛋白^[3]。工业化生产及科学研究也需要大量的活性蛋白。

真核细胞(酵母、昆虫、中国仓鼠卵巢细胞)表达二硫键蛋白,时间长且花费大,而无细胞表达体系难以实现扩大化生产。大肠杆菌是目前首选宿主菌之一,因其具备生长快、操作简单、产量高等特点备受人们青睐^[3]。大肠杆菌中二硫键蛋白的形成定位于细胞周质,但蛋白产率低。而大肠杆菌细胞质缺乏真核蛋白表达所需的翻译后加工机制,因此多数二硫键蛋白在细胞质中形成包涵体。蛋白包涵体只能通过变性、复性等过程获取一定比例的活性蛋白,且方法繁琐、产率低下、通用性不强。因此如何改善大肠杆菌细胞的表达环境以获得高产率的活性二硫键蛋白,是科学家们致力于解决的难题。本文介绍了大肠杆菌中二硫键的形成机制,并综述近年来二硫键蛋白表达策略的最新研究成果,为富含二硫键蛋白在大肠杆菌反应器的重组表达或工业化生产提供理论基础。

1 大肠杆菌细胞周质二硫键的形成

1.1 周质蛋白分泌机制

多数大肠杆菌分泌蛋白首先被合成蛋白前体。它们的信号肽由 Sec 分子识别,根据信号肽的种类,Sec 机制分为翻译后和共翻译转运两种方式。在前者,细胞质内的伴侣分子 SecB 与前体蛋白结合,并维持蛋白的未折叠状态直至接触移位酶。而共翻译转运方式是在翻译过程中蛋白的信号肽由信号识别颗粒(signal recognition particle, SRP)识别,整个 SRP-核糖体-新生多肽复合物再与 Sec 移位酶结合^[4]。少数分泌蛋白采取一种双精氨酸转运系统(twin arginine translocation system, Tat),该系统转运蛋白的信号肽带有特征性双精氨酸基序。与 Sec 机制不同,Tat 系统中蛋白以紧密折叠形式经过细胞膜。该系统可能与细菌产生抗生素耐药性有关^[4]。

1.2 DsbA/DsbB 氧化系统

转运至细胞周质的多肽由 Dsb 蛋白(DsbA-DsbG)催化形成二硫键。肽链半胱氨酸的硫醇盐阴离子首先亲和攻击 DsbA 的活性中心,并与 DsbA 形成分子间二硫键中间体。该中间体很不稳定,由肽链另一个硫醇盐阴离子亲和攻击而快速释放,肽链形成二硫键,DsbA 被还原^[5]。

还原态 DsbA 经 DsbB 的重新氧化实现活性再生,而 DsbB 则通过电子传递系统再被氧化。DsbB 是细胞内膜蛋白,它具有 4 个跨膜螺旋的核心区和两段暴露于细胞周质的柔性区。DsbB 有两对二硫键,其柔性区的二硫键首先从 DsbA 获得电子,再传递给跨膜区附近的半胱氨酸对^[6]。该对二硫键被还原后,其中一个半胱氨酸可与辅因子醌的芳环形成电荷传递复合物。有氧条件下,电子经细胞色素 bo、bd 氧化酶传递给氧气分子,而缺氧时,电子的最终受体改变,由甲基萘醌将电子传给延胡索酸或硝酸盐等^[7](图 1)。

1.3 DsbC/DsbD 异构化系统

DsbA 参与二硫键形成反应是快速且非特异的,它倾向于催化顺序排布的半胱氨酸对形成二硫键。因此蛋白存在多对非连续性二硫键时,就容易发生错误配对,其在细胞内积累或被降解^[9]。大肠杆菌存在相应的纠错机制—周质中的二硫键异构酶 DsbC,可识别并帮助错误折叠蛋白恢复自然状态。

体内的 DsbC 是两个亚基组成的同源二聚体,整体呈 V 形。每个亚基具有二聚体化和硫氧还蛋白两个功能域,它们依靠一段短的螺旋区连接。DsbC 共有 4 个半胱氨酸,硫氧还蛋白功能域 C 端的两个半胱氨酸形成二硫键,稳定 DsbC 的空间结构^[10]。N 端的半胱氨酸对是 DsbC 的活性中心,它们具有 CXXC 催化模序,并由 DsbD 维持还原状态。DsbD 是细胞内膜蛋白,它包含 3 个模块:跨膜功能域 DsbD β ,细胞周质功能域 DsbD α 和 DsbD γ 。每个功能域有一对活性半胱氨酸。DsbD β 的半胱氨酸对首先从细胞质硫氧还蛋白获取电子,再传递到 DsbD γ 功能域,然后经 DsbD α 最终将电子传递给 DsbC^[11](图 1)。DsbD 及其家族蛋白是目前已知的一类将电子从细胞质膜传递到细胞周质的氧化还原酶。

事实上,DsbC 并不是 DsbD 的唯一底物。DsbG 为 DsbC 的同源类似物,它具有 CXXC 催化模序,由 DsbD 维持还原态。最新研究发现^[12],除了异构酶活性,细胞周质的 DsbG 还发挥还原酶作用。某些周质蛋白存在单一半胱氨酸,它们暴露于氧自由基环境易生成次磺酸,或被进一步氧化成磺酸而损害蛋白活性。DsbG 表面的负电荷区域适于识别已折叠蛋白,并作为周质还原系统的关键因子防止蛋白的单一半胱氨酸遭受氧化损伤。而 DsbC 内部排列的疏水氨基酸,似乎更利于它与未

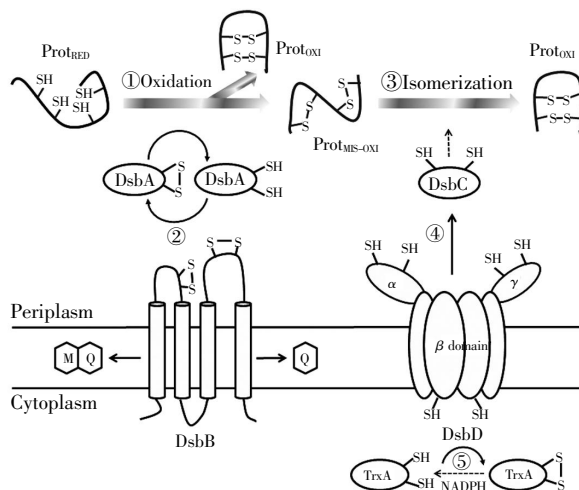


图1 大肠杆菌细胞周质中二硫键的形成

分泌到细胞周质的新生多肽(Prot_{RED})。①首先由 DsbA 引入二硫键生成氧化产物 (Prot_{OXI})；②还原态 DsbA 再由 DsbB 重新氧化。DsbA 提供电子经 DsbB 柔性区半胱氨酸对传递给跨膜螺旋区附近的半胱氨酸对。有氧条件下,电子再通过醌(Q)传递给氧气,在无氧条件时,甲基萘醌(MQ)将电子传递给延胡索酸等；③若新生多肽的二硫键发生错误配对(Prot_{MIS-OXI}),它们由 DsbC 识别,异构化形成自然状态或被还原后重新由 DsbA 氧化；④DsbC 活性中心半胱氨酸由 DsbD 维持还原状态。DsbD β 模块的半胱氨酸对首先从细胞质硫氧还蛋白(TrxA)获得电子,再经过 DsbD γ , DsbD α 的半胱氨酸对,将电子最终传递到 DsbC；⑤TrxA 的电子最终来自细胞质 NADPH 池^[8]。

Fig.1 Periplasmic disulfide bond formation in *E. coli*

①DsbA forms a disulfide-bonded complex with its reduced substrate (Prot_{RED}) resulting in the formation of a disulfide bond in the substrate protein (Prot_{OXI}) and the reduction of DsbA；②DsbA is re-oxidized by DsbB. The cysteine pair of DsbB in periplasmic loop donates the electrons that it has received from DsbA to the cysteine pair near the transmembrane helical segments. Then the electrons are transferred either to oxygen by quinone (Q) in aerobic conditions or to fumarate by menaquinone (MQ) in anaerobic conditions；③If the substrate protein is mis-oxidized (Prot_{MIS-OXI}) by DsbA, the misfolded protein is recognized by DsbC and is either isomerized to its native or reduced state, allowing DsbA to have another chance correctly oxidizing the protein.；④The cysteine pair of DsbD β receives its electrons from the cytoplasmic thioredoxin (TrxA). Then these electrons are transferred to the DsbD γ domain, which in turn passes the electrons to the DsbD α domain before they eventually reach DsbC；⑤TrxA ultimately receives its electrons from the cytoplasmic pool of NADPH^[8].

折叠蛋白作用并纠正错配二硫键。另外, DsbC 也可作为 DsbG 功能的替补^[12]。

2 大肠杆菌细胞质二硫键的形成

2.1 野生型菌株细胞质的还原途径

大肠杆菌细胞质的还原环境不利于蛋白的氧

化。Derman 等^[13]的开创性工作首先阐明了大肠杆菌细胞质中两条主要的还原途径。一条是硫氧还蛋白途径:包括硫氧还蛋白 TrxA 和 TrxC,并由硫氧还蛋白还原酶 TrxB 维持还原态;另一条是谷氧还蛋白途径:其核心是谷胱甘肽还原酶(Glutathione reductase),它能还原 GshA 和 GshB 两种酶,这两类酶与细胞质还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)的形成有关。在细胞质中, GSH 可直接参与二硫键的还原反应,它首先与底物形成中间体复合物,再由一种谷氧还蛋白(Grx1, Grx2, Grx3)使中间体释放,生成还原态底物和氧化态谷氧还蛋白,后者又在 GSH 作用下重新恢复还原态^[14]。两条电子传递网络的还原电势均来自细胞质 NADPH 池^[8](图 2)。

2.2 突变菌株细胞质的氧化途径

在研究野生型菌株细胞质还原途径时, Derman 等^[13]发现,同时缺失两个核心基因 *trxB* 和 *gor* 的菌株无法存活,但这种致死性可被细胞质内过氧化物酶 AhpC 突变抑制。AhpC* 突变体具有二硫键还原酶活性,它能在细胞质中富集还原态 Grx1, 保证菌株活力^[15]。*trxB* 的缺失使细胞质内氧化型硫氧还蛋白 TrxA、TrxB 积累,它们可催化形成二硫键。此突变株被称为 FÅ113 (*trxB*, *gor*, *ahpC**)^[8],商业名称是 Origami。利用 Origami 使胶原

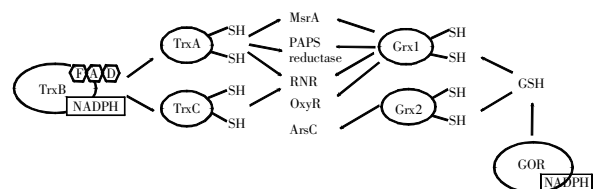


图2 大肠杆菌细胞质的还原途径

细胞质中有两条主要的还原途径,一条包括硫氧还蛋白 TrxA 和 TrxC,并由硫氧还蛋白还原酶 TrxB 维持它们的还原态。另一条途径包括谷胱甘肽还原酶(GOR)、谷胱甘肽(GSH)和谷氧还蛋白(Grx1, Grx2)。两条还原途径中的还原底物存在部分重叠,如蛋氨酸硫氧化物还原酶(MsrA)、核苷酸还原酶(RNR)等。还原途径的电子最终来自细胞质 NADPH 池^[11]。

Fig.2 The reducing pathways of the cytoplasm in *E. coli*

There are two major reducing pathways in the cytoplasm, one way contains the thioredoxin reductase (TrxB) and its redox partners TrxA and TrxC, the other way includes glutaredoxins (Grx1, Grx2) and the couple glutathione (GSH)/glutathione reductase (GOR). The two branches of the reducing pathways can overlap in their substrates, such as Methionine sulfoxide reductase (MsrA), Ribonucleotide reductase (RNR) and so on. The electrons are eventually derived from NADPH reservoir in the cytoplasm^[11].

4-脯氨酰羟化酶在细胞质的表达量远高于野生型 BL21 的细胞周质^[16]。此外,该氧化型细胞质也用于富集功能性脂肪酶 B、神经生长素的 Ig2 功能域及几丁质酶等^[17]。

(*trxB*⁻, *gor*⁻) 菌株虽然可实现蛋白的氧化折叠,但其细胞质缺乏二硫键异构化途径。Bessette 等^[18]研究发现,DsbC 在细胞质过量表达可有效提高二硫键蛋白的活性产率。在体外的无细胞体系,它也有同样效果^[19]。受此启发,2012年,Lobstein 等^[3]基于(*trxB*⁻, *gor*⁻)菌株,将 *dsbC* 基因插入严格控制的细菌 rRNA 转录启动子 *rnnB* 下游,使 DsbC 在细胞质稳定且过量表达,改造菌株命名为 SHuffle(图 3)。他们比较了 3 种多二硫键蛋白:荧光素酶(*Gaussia luciferase*, Gluc)、尿激酶、组织纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator, vtPA)在 SHuffle 中的表达活性,认为该菌株促进蛋白折叠具有底物特异性。但 SHuffle 仍成为表达二硫键蛋白的新选择,如 Tait 等^[20]利用 SHuffle 表达人疱疹病毒膜蛋白 U24,其产量可比普通的 BL21 (DE3)细胞提高 4.3 倍。

2.3 DsbC 在蛋白二硫键折叠中的研究

在细胞质或周质中表达二硫键蛋白是否需要 DsbC 的辅助,这与二硫键的形成机制有关。在细胞周质,DsbA 首先向未折叠多肽引入二硫键,它倾向于催化顺序排布的半胱氨酸对的氧化。比较而言,(*trxB*⁻, *gor*⁻) 突变体细胞质的二硫键形成机制尚不明确。但与周质中未折叠多肽不同,Kramer 等^[21]报道核糖体可促进新生肽链形成二级结构,合成蛋白在核糖体通道出口处或已存在部分折叠。这利于氧化酶催化肽链形成正确的二硫键,因而降低了细胞质蛋白折叠对 DsbC 的依赖。这似乎可解释尿激酶在细胞周质表达时的活性完全依赖 DsbC,而在细胞质表达对 DsbC 的依赖性仅为 50%^[18]。

DsbC 在某些情况下对细胞质蛋白表达非常有利。例如,G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs) 是最著名的药物靶标分子家族,一直以来备受科学家关注。B 类 GPCR 的细胞外功能域(extracellular domain, ECD)包含 3 对保守的二硫键,为蛋白的获取及结构解析带来了较大困难。2008年,Pioszak 等^[22]将人类甲状旁腺素受体的 ECD 构建到 MBP 融合体系,并与 DsbC 在 Origami 细胞质内共表达。然后利用目标蛋白与 DsbC 在体外谷胱甘肽缓冲液中孵育,进行蛋白二

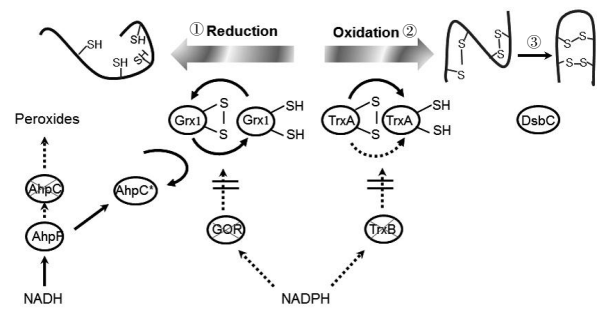


图 3 SHuffle 菌株细胞质内二硫键的形成机制

突变 *trxB* 和 *gor* 基因的大肠杆菌无法生存,但增加 *ahpC* 的突变却能挽救这种致死性。*AhpC*^{*} 突变体获得还原 Grx1 的能力。①Grx1 可参与底物的还原反应;②细胞质中积累的氧化型硫氧还蛋白如 TrxA 充当氧化剂,催化二硫键的形成;③SHuffle 细胞质过表达的 DsbC 用以纠正错配二硫键,使肽链恢复自然状态。图中虚线所示路径被阻断,交叉符号所示突变基因。为了简化,图示省略 Grx2,Grx3 和 TrxB,只显示 Grx1 和 TrxA^[3]。

Fig.3 Disulfide bond formation in the cytoplasm of SHuffle strains

Disruption of the thioredoxin pathway (TrxB) and the glutaredoxin pathway(GOR) is lethal. Selection of *trxB*, *gor* suppressor resulted in mutant *AhpC*^{*} which gained the ability to reduce Grx1. ①Reduced Grx1 can catalyze the reduction of proteins.; ②Accumulation of oxidized thioredoxins such as TrxA catalyzes the formation of disulfide bonds.; ③If the protein is mis-oxidized, it is isomerized to its native correctly folded state by cytoplasmic DsbC. Disabled protein interactions are represented by dotted lines. The cross represents gene mutation. For simplicity, other reductases (Grx2, Grx3 and TrxB) are omitted and only Grx1 and TrxA are indicated^[3].

硫键重排反应。他们最终获得正确折叠的样品,解析出该蛋白结构。随后,利用此体系他们先后成功表达了皮质激素释放因子受体^[23]和垂体腺苷酸环化酶受体^[24]。

3 多二硫键蛋白在大肠杆菌中的表达策略

随着大肠杆菌细胞中二硫键形成机制的深入揭示,很多理论广泛应用于真核生物二硫键蛋白表达。特别是近年来人们不断探寻新的方法和体系,使大肠杆菌表达多二硫键蛋白的研究取得了较多成果。

3.1 分子伴侣辅助二硫键蛋白折叠

一般地,肽链经过疏水塌缩、空间盘曲、侧链聚集等折叠过程形成其天然构象。二硫键的形成和肽基脯氨酰键异构化是其中的限速步骤。经典的“自组装学说”认为,肽链氨基酸序列包含了蛋白折叠所需的全部信息。随着研究深入,Ellis^[25]的“辅助性组装学说”提出体内肽链的折叠需要分子伴侣的辅

助。分子伴侣可为二硫键形成等限速步骤提供较长的折叠时间,促进蛋白组装成自然状态。

3.1.1 周质分子伴侣辅助二硫键蛋白表达

细胞周质的分子伴侣包括 FkpA、Skp、DegP、SurA 等。FkpA 是一类通用的折叠增强子,兼具分子伴侣与肽基脯酰胺顺反异构酶 (peptidyl-propyl cis-trans isomerase, PPIase) 活性。它是 V 型的同源二聚体,每个亚基的 N 端参与二聚体化或具有分子伴侣活性,C 端为 PPIase 功能域。FkpA 以二聚体界面形成的疏水口袋结合底物,并促进柔性 C 端接近底物脯氨酰键^[26]。它的 PPIase 活性催化某些稳定的反式肽基脯氨酰键,异构成功能蛋白所必需的顺式构型。目前已发现的 PPIase 分属于 3 个蛋白家族:亲环素、FK506 结合蛋白以及细小菌素蛋白^[4]。

SurA 与细小菌素蛋白类型的 PPIase 具有同源性,它最早从细菌抵抗饥饿胁迫中被鉴定。SurA 的空间构象赋予其分子伴侣活性。它的外形类似非规则的哑铃状,其核心模块有一个较深的口袋,偏爱识别含 Ar-X-Ar 基序的底物。Ar 指芳香族氨基酸,X 指任意氨基酸^[26]。其余分子伴侣,如 Skp 通常捕获由 Sec 分泌机制转运的未折叠多肽。DegP 是 HtrA 丝氨酸蛋白酶家族的第一位成员,它用于清除细胞周质变性或聚集蛋白,其分子伴侣或蛋白酶活性受温度调控^[26]。

因细胞周质独特的氧化环境,可将某些二硫键蛋白分泌于周质中表达。但是分泌效率的不可控性以及周质 Dsb 蛋白、分子伴侣含量偏低,带来了活性蛋白产量不高等问题。在过表达分子伴侣协助下,蛋白折叠效率增加,活性产率可能提高。2011 年,Schlapschy 等^[27]将 FkpA、SurA 以及 DsbA、DsbC 共同构建成新型辅助质粒 pTUM4,使 4 种折叠酶在细胞周质中过表达,提高了分泌蛋白的折叠效率。另外,筛选提升目标蛋白分泌效率的菌株类型也是必要的,如 JM83、HM125、KS272 等。Schlapschy 已利用 pTUM4 辅助了多种二硫键蛋白的表达,包括恶性疟原虫表面蛋白 48/45,树突细胞特异性细胞间黏附分子-3-结合的非整合素以及各种抗原结合片段等^[27]。

3.1.2 细胞质分子伴侣增加二硫键蛋白可溶性

相比细胞周质,大肠杆菌细胞质中存在更多的分子伴侣,与折叠相关的分子伴侣系统包括三类^[26]: 触发因子(trigger factor, TF)、DnaK-DnaJ-GrpE 和 GroEL-GroES。细胞质中,短的新生多肽首先与核

糖体结合的 TF 相互作用,随着肽链延伸,长链多肽由 DnaK 捕获。DnaK 的 N 端功能域水解 ATP 供能,协助 C 端完成多肽的折叠。共伴侣素 DnaJ 可上调 DnaK 的 ATP 酶活性,而增强 DnaK 与底物的结合力。另一共伴侣素 GrpE 通过催化 ATP/ADP 交换反应介导底物释放。除非底物已完成折叠,否则它可能将被传递给下游的 GroEL-GroES 系统。GroEL 与共伴侣素 GroES 形成“折叠笼”结构^[28],为底物进一步折叠提供良好的环境。

在大肠杆菌细胞质,多数重组蛋白受控于强启动子,它们的表达水平通常较高。但宿主细胞自身的分子伴侣含量或许无法满足新生肽链正确折叠的需求,导致目标蛋白可溶性降低,甚至形成包涵体。共表达分子伴侣可能有效辅助二硫键蛋白折叠,增加蛋白可溶性。例如,Kyratsous 等^[29]设计 DnaK 与 GroEL 的融合载体,在大肠杆菌细胞质中获得了鼠类肌蛋白的可溶产物。另外,共表达 DnaKJ 可防止镁离子转运蛋白 CorA 形成包涵体^[30],或提高人类粒系集落刺激因子(human granulocyte colony stimulating factor, hG-CSF)在细胞周质的表达量^[31]。

3.2 融合标签辅助二硫键蛋白表达

除了分子伴侣,利用 Dsb 蛋白与目标蛋白融合表达,也可促进二硫键正确形成。目前,已有包含 Dsb 蛋白的商业化载体供选择,如 pET-39(DsbA)、pET-40(DsbC)。另外,一些细胞质融合标签,如 MBP(maltose-binding protein)、NusA(N-Utilization substance)、TRX(thioredoxin)等也被广泛使用。MBP 由大肠杆菌 K12 的 malE 基因编码,它能增加融合蛋白的溶解性。而且 MBP 不含半胱氨酸,避免了与目标蛋白半胱氨酸形成错配二硫键的问题。MBP 已成功应用于真核细胞蛋白以及人工合成的单链抗体(single-chain antibody fragment, scFv)的可溶表达^[32]。Houry 等^[33]揭示 NusA 是分子伴侣 GroEL 在体内的必须底物。所以 NusA 可能招募分子伴侣帮助蛋白折叠。另一种 TRX 标签可防止细胞质蛋白聚集沉淀,甚至挽救错折叠的多二硫键肽链,如槲寄生毒素、猪胃蛋白酶原 A^[17]等。TRX 维持蛋白稳定性的机制尚不清楚,但它可能依赖伴侣活性辅助 scFv 的折叠,理由是突变其催化中心的半胱氨酸,它仍能促进活性 scFv 的表达^[17]。

3.3 二硫键从头形成体系促进蛋白表达

自然界中二硫键的形成可以在三类细胞内隔

室中完成,真核细胞内质网、线粒体内膜空间以及原核细胞的细胞周质。相对于这些细胞隔室,大多数野生型原核细胞质几乎观察不到二硫键蛋白的存在。Derman 等^[13]通过(*trxB*, *gor*, *ahpC*)的突变,首先实现了大肠杆菌细胞质内生产二硫键蛋白。

在(*trxB*⁻, *gor*⁻)工程菌中,细胞质硫氧还蛋白参与硫醇-二硫键的交换反应,即它依靠还原底物(如核苷酸还原酶)而将二硫键转移到其他蛋白(如碱性磷酸酶)中,硫氧还蛋白本身不能催化二硫键从头形成。所以 Origami 等生产的蛋白实为某些代谢途径的副产物,蛋白产率普遍偏低^[34]。

3.3.1 Erv1p 体系在二硫键蛋白表达中的应用

细胞内隔室的情况相反,它们存在二硫键从头形成的催化酶,如巯基氧化酶,包括内质网的 Ero1、酿酒酵母线粒体内膜空间的 Erv1p 等。如果向大肠杆菌细胞质引入二硫键从头形成体系,可能会大幅提高活性蛋白的产率。但是,此类巯基氧化酶不是直接作用于底物,它们需要媒介蛋白的辅助,如 Ero1 依赖 PDI, Erv1p 依赖 Mia40 等^[34]。另据文献报道,黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)存在时,酿酒酵母的 Erv1p 可能独立于 Mia40,直接利用氧气分子催化巯基形成二硫键^[35]。另外,人们发现没有任何辅因子时, Erv1p 能有效地使变性牛胰胰蛋白酶抑制剂(含两对二硫键)重新恢复自然状态^[34]。因此 Erv1p 可能是一种单独的催化二硫键从头形成的氧化酶。

利用这一特性,2010 年 Hatahet 等^[34]将酿酒酵母的 Erv1p 引入野生型大肠杆菌细胞质,首次获得比 (*trxB*⁻, *gor*⁻) 菌株产率更高的活性目标蛋白。他们的结果不仅颠覆了长久以来野生型原核细胞质不能产生二硫键的普遍观点,还使人们认识到蛋白的氧化折叠除与反应环境相关,还与催化酶类有关。随后,Nguyen 等^[36]报道,利用预表达体系可进一步提高 Erv1p 对蛋白氧化的促进效应。但同时还需要融合标签防止折叠中间体聚集。他们通过在细胞质预先表达 Erv1p 与二硫键异构酶,使活性 vtPA(含有 9 对二硫键)的产量比过去仅依靠 DsbC 共表达时提高 800 倍以上。另外,该体系也可应用于分子间二硫键蛋白,如人类抵抗素(Resistin)是一种抑制脂肪细胞摄取糖分的激素,成熟的 Resistin 含有 5 对二硫键,并依靠 1 对分子间二硫键形成同源二聚体。以往的表达体系难以获得可溶的或均质蛋白,利用上述方法显著提高 Resistin 同型二聚体的产率。由此可见,这类巯基

氧化酶似乎可以促进多二硫键蛋白的高效表达。

3.3.2 QSOX 体系在二硫键蛋白表达中的应用

另一类静息巯基氧化酶 (quiescin-sulfhydryl oxidase, QSOX) 是目前已知的唯一具有多功能域的氧化酶。QSOX 包括两个类似硫氧还蛋白的功能域、富含螺旋的间隔区以及 FAD 结合功能域。与其他单功能域巯基氧化酶 Ero1, Erv1 等类似, QSOX 可催化二硫键的从头形成,且具有更强的氧化能力^[37]。利用这一特点,2012 年 Abskharon 等^[38]报道了一种新的大肠杆菌表达体系,他依靠人源重组静息巯基氧化酶(HsQSOX),在细胞质中成功获得具有生物活性的肌蛋白。

随后研究人员针对 QSOX 催化二硫键形成展开了深入研究。2014 年 Zhang 等^[39]将 QSOX 与 PDI 在 Origami B 细胞质中融合表达,构建了一种超氧化性细胞(superoxidizing cells)。他们以一类新近报道的对氧化还原敏感的绿色荧光蛋白(redox-sensitive green fluorescent protein, roGFP) 监测细胞内巯基-二硫键氧化还原电位,发现新型超氧化细胞的细胞质氧化还原电位为-196 mV,比哺乳动物或酵母细胞内质网(约为-230 mV)还高。因此,这种超氧化性细胞非常利于二硫键的形成,明显提高富含二硫键蛋白 Gluc、vtPA 等的氧化折叠效率,为利用大肠杆菌异源表达真核生物多二硫键蛋白提供了新策略。

4 展望

蛋白的氧化折叠除了具有热力学、动力学基础之外,还涉及复杂的分子体系,所以它是一个难以解决的科学问题。如果蛋白还存在二硫键、糖基化等修饰,其表达折叠将更加复杂和难以控制。虽然近年来,人们利用(*trxB*⁻, *gor*⁻)工程菌株、超氧化性细胞或者二硫键从头形成体系,已成功地在大肠杆菌中表达多种二硫键蛋白。但是这些方法存在局限性,它们或许只适用于小范围的蛋白。随着生产、研究的发展,人们越来越需要更多新型、通用的二硫键蛋白表达菌株或体系,这将是一个富有挑战性的课题。但值得一提的是,2014 年 Georgescauld 等^[28]发表的研究成果解析了分子伴侣辅助蛋白折叠组装的作用机制,这为科学家们理解蛋白折叠的分子机制带来了巨大帮助。同时,这些理论成果也有助于优化已有的方法策略,或为研发高效的二硫键蛋白表达体系创造新的契机。

参考文献 (References)

- [1] DEMAÏN A L, VAISHNAV P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms[J]. *Biotechnology Advances*, 2009,27(3):297–306.
- [2] WONG J W, HO S Y, HOGG P J. Disulfide bond acquisition through eukaryotic protein evolution[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011,28(1):327–334.
- [3] LOBSTEIN J, EMRICH C A, JEANS C, *et al.* SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm[J]. *Microbial Cell Factories*, 2012,11:56–71.
- [4] GOEMANS C, DENONCIN K, COLLET J F. Folding mechanisms of periplasmic proteins[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014,1843(8):1517–1528.
- [5] DARBY N J, CREIGHTON T E. Catalytic mechanism of DsbA and its comparison with that of protein disulfide isomerase[J]. *Biochemistry*, 1995,34(11):3576–3587.
- [6] INABA K, MURAKAMI S, SUZUKI M, *et al.* Crystal structure of the DsbB–DsbA complex reveals a mechanism of disulfide bond generation[J]. *Cell*, 2006,127(4):789–801.
- [7] BADER M, MUSE W, BALLOU D P, *et al.* Oxidative protein folding is driven by the electron transport system[J]. *Cell*, 1999,98(2):217–227.
- [8] BERKMEN M. Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2012,82(1):240–251.
- [9] KOJER K, RIEMER J. Balancing oxidative protein folding: The influences of reducing pathways on disulfide bond formation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014,1844(8):1383–1390.
- [10] MCCARTHY A A, HAEBEL P W, TÖRRÖNEN A, *et al.* Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from *Escherichia coli*[J]. *Nature Structural Biology*, 2000,7(3):196–199.
- [11] HATAHET F, BOYD D, BECKWITH J. Disulfide bond formation in prokaryotes: History, diversity and design[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014,1844(8):1402–1414.
- [12] DEPUYDT M, LEONARD S E, VERTOMMEN D, *et al.* A periplasmic reducing system protects single cysteine residues from oxidation[J]. *Science*, 2009,326(5956):1109–1111.
- [13] DERMAN A I, PRINZ W A, BELIN D, *et al.* Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*[J]. *Science*, 1993,262(5140):1744–1747.
- [14] MASIP L, VEERAVALLI K, GEORGIU G. The many faces of glutathione in bacteria[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2006,8(5–6):753–762.
- [15] RITZ D, LIM J, REYNOLDS C M, *et al.* Conversion of a peroxidase into a disulfide reductase by a triplet repeat expansion[J]. *Science*, 2001,294(5540):158–160.
- [16] NEUBAUER A, NEUBAUER P, MYLLYHARJU J. High-level production of human collagen prolyl 4-hydroxylase in *Escherichia coli*[J]. *Matrix Biology*, 2005,24(1):59–68.
- [17] de MARCO A. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2009, (8): 26–74.
- [18] BESSETTE P H, ASLUND F, BECKWITH J, *et al.* Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999,96(24):13703–13708.
- [19] ZAWADA J F, YIN G, STEINER A R, *et al.* Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production—a new approach for shortening protein production development timelines[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011,108(7):1570–1578.
- [20] TAIT A R, STRAUS S K. Overexpression and purification of U24 from human herpesvirus type-6 in *E. coli*: unconventional use of oxidizing environments with a maltose binding protein-hexahistidine dual tag to enhance membrane protein yield[J]. *Microbial Cell Factories*, 2011, (10): 51–72.
- [21] KRAMER G, BOEHRINGER D, BAN N, *et al.* The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009,16(6):589–597.
- [22] PIOSZAK A A, XU H E. Molecular recognition of parathyroid hormone by its G protein-coupled receptor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008,105(13):5034–5039.
- [23] PIOSZAK A A, PARKER N R, SUINO-POWELL K, *et al.* Molecular recognition of corticotropin-releasing factor by its G-protein-coupled receptor CRFR1[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008,283(47):32900–32912.
- [24] KUMAR S, PIOSZAK A, ZHANG C, *et al.* Crystal structure of the PAC1R extracellular domain unifies a consensus fold for hormone recognition by class B G-protein coupled receptors[J]. *PLoS One*, 2011,6(5):19682–19702.
- [25] ELLIS R J. The general concept of molecular chaperones[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 1993,339(1289):257–261.
- [26] BANEYX F, MUJACIC M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*[J]. *Nature Biotechnology*, 2004,22(11):1399–1408.
- [27] SCHLAPPSCHY M, SKERRA A. Periplasmic chaperones used to enhance functional secretion of proteins in *E. coli*[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2011,705:211–224.
- [28] GEORGESCAULD F, POPOVA K, GUPTA A J, *et al.* GroEL/ES chaperonin modulates the mechanism and accelerates the rate of TIM-barrel domain folding[J]. *Cell*, 2014,157(4):922–934.
- [29] KYRATSOS C A, PANAGIOTIDIS C A. Heat-shock protein fusion vectors for improved expression of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2012,824:109–129.
- [30] CHEN Y, SONG J, SUI S F, *et al.* DnaK and DnaJ facilitated the folding process and reduced inclusion body formation of magnesium transporter CorA overexpressed in *Escherichia coli*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2003,32(2):221–231.
- [31] PÉREZ-PÉREZ J, MARTINEZ-CAJA C, BARBERO J L, *et al.* DnaK/DnaJ supplementation improves the periplasmic production of human granulocyte-colony stimulating factor in *Escherichia coli*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995,210(2):524–529.
- [32] BACH H, MAZOR Y, SHAKY S, *et al.* *Escherichia coli* maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001,312(1):79–93.
- [33] HOURY W A, FRISHMAN D, ECKERSKORN C, *et al.* Identification of *in vivo* substrates of the chaperonin GroEL[J]. *Nature*, 1999,402(6758):147–154.
- [34] HATAHET F, NGUYEN V D, SALO K E, *et al.* Disruption of reducing pathways is not essential for efficient disulfide bond formation in the cytoplasm of *E. coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, (9): 67–75.
- [35] LEE J, HOFHAUS G, LISOWSKY T. Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase[J]. *FEBS Letters*, 2000,477(1–2):62–66.
- [36] NGUYEN V D, HATAHET F, SALO K E, *et al.* Pre-expression of a sulfhydryl oxidase significantly increases the yields of eukaryotic disulfide bond containing proteins expressed in the cytoplasm of *E. coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2011,10:1–13.
- [37] ZHENG W, CHU Y, YIN Q, *et al.* Crucial effect of the first CXXC motif of human QSOX 1b on the activity to different substrates[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2011,149(3):293–300.
- [38] ABSKHARON R N, RAMBOARINA S, EL H H, *et al.* A novel expression system for production of soluble prion proteins in *E. coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2012,11:6–16.
- [39] ZHANG W, ZHENG W, MAO M, *et al.* Highly efficient folding of multi-disulfide proteins in superoxidizing *Escherichia coli* cytoplasm[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014,111(12):2520–2527.