

酵母表面展示系统研究进展*

郭波** 谢佩蓉 邹强 郑萍

(第三军医大学免疫学教研室, 全军免疫学研究所, 重庆 400038)

摘要 酵母表面展示系统是继噬菌体展示技术创立后发展起来的真核展示系统, 酵母的蛋白质折叠和分泌机制与哺乳动物细胞非常相似, 对人的蛋白质表达和展示更具优越性. 酵母细胞颗粒大, 可用流式细胞仪进行筛选和分离. 目前报道的两种酵母展示系统分别以 α 或 a 凝集素作为融合骨架. 在蛋白质的定向进化、口服疫苗的研究等多方面均有报道.

关键词 酵母表面展示, 酿酒酵母, 定向进化, 口服疫苗

学科分类号 Q78

自丝状噬菌体表面展示技术创立以来, 表面展示技术的发展日新月异. 短短几年, 不同的实验室又分别发展了 λ 噬菌体、T4 噬菌体、T7 噬菌体、细菌、杆状病毒、酵母等多种表面展示系统^[1~5], 在高亲和力抗体及多肽药物的筛选、蛋白质抗原表位分析等许多方面得到了广泛应用. 本文就近年发展起来的酵母细胞表面展示系统作一综述.

1 酿酒酵母的表面结构

酿酒酵母是具有细胞壁的单细胞真核微生物. 细胞壁分为两层, 内层提供细胞壁的强度, 由 β -1, 3 葡聚糖和 β -1, 6 葡聚糖与少量几丁质组成. 外层由甘露糖蛋白组成, 决定了大多数细胞的表面特性. 甘露糖蛋白共价连接到内层的葡聚糖上^[6].

a 凝集素和 α 凝集素是酵母细胞壁上的两种甘露糖蛋白, 它们在酿酒酵母的 a 交配型 (MATa) 和 α 交配型 (MAT α) 单倍体细胞之间介导细胞与细胞的性粘附, 使细胞融合形成双倍体^[7].

2 酵母表面展示系统的类型

目前已报道的酵母表面展示系统有两种, 目的蛋白分别与 α 或 a 凝集素融合, 展示于酵母细胞表面.

2.1 目的蛋白- α 凝集素表面展示系统

此系统将目的蛋白作为 N 端, 与 α 凝集素 C 端部分融合, 目的蛋白经 α 凝集素展示于酵母细胞表面.

α 凝集素共价连接到细胞壁的葡聚糖上^[8], 其锚定能力由蛋白质 C 端 320 个氨基酸组成, 富含

Ser/Thr 残基. Ser/Thr 富集区因广泛存在的 O-糖基化而拥有一个杆状构象, 可作为空间支撑物发挥作用.

迄今, 已经有多个应用 α 凝集素的 C 端作为融合蛋白的报道. 第一个通过此系统表达的异源蛋白是 α -半乳糖苷酶^[8] (图 1). Schreuder 等将来自

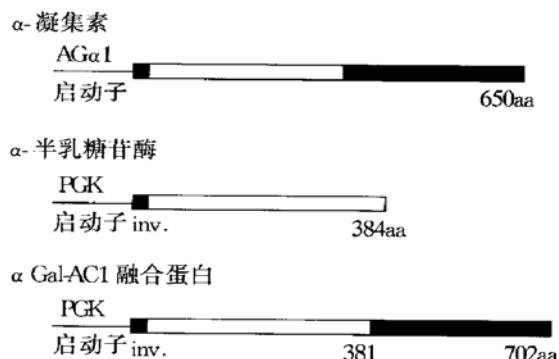


Fig. 1 Construction of the α -galactosidase α -agglutinin (α -Gal-AC1)

图 1 半乳糖苷酶- α 凝集素 (α -Gal-AC1) 融合蛋白的构建

瓜儿豆胶的 α -半乳糖苷酶的基因插入到酿酒酵母转化酶分泌信号和 α 凝集素 C 端部分编码序列之间. α -半乳糖苷酶和 α -半乳糖苷酶- α 凝集素 (α -Gal-AC1) 融合蛋白, 均由固有的磷酸果糖激酶 (PGK) 启动子控制, 并且是多拷贝的. 批量培养

* 国家自然科学基金资助项目 (30080032).

** 通讯联系人.

Tel: 023-68752238, E-mail: immuno06@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2001-04-02, 接受日期: 2001-05-17

过程中检测了细胞和生长介质中的酶活性, α -半乳糖苷酶被高效分泌入培养介质, 而 α Gal-AC1 融合蛋白主要与细胞有关. 两种蛋白质以相似的水平表达, 表明 α -凝集素 C 端对蛋白质合成没有影响. 70% 的 α Gal-AC1 融合蛋白紧密地连接到细胞壁葡聚糖上, 并且结合于细胞壁的酶比从介质中分离得到的酶活性稳定得多. 应用 α -半乳糖苷酶的多克隆抗血清进行的免疫荧光分析表明 α Gal-AC1 融合蛋白出现在完整的细胞上. 因为抗体不能穿过细胞壁, 提示 α -半乳糖苷酶可能插入到了细胞壁的外层甘露糖蛋白质.

但可检测到的 α Gal-AC1 融合蛋白的数目, 在一群细胞内变异极大, 这种变异依赖于每个细胞内的基因拷贝数. Schreuder 等^[9]将 α -凝集素 C 端基因上游含有 HBV 表面蛋白 (HBsAg) 基因片段的构件体克隆到单拷贝质粒、多拷贝质粒, 及多拷贝整合载体, 应用 HBsAg 单抗染色, 发现包含单拷贝质粒的细胞没有免疫荧光标记. 相反, 在染色强度上, 用多拷贝质粒转化的细胞与用 α Gal-AC1 融合蛋白检测的细胞有相似的变异, 作者认为这是因质粒的不稳定性所致. 在所有的培养细胞中, 多拷贝整合入基因组的细胞显示有一致的明显染色, 但多拷贝整合的转化子染色强度则较多数携带多拷贝质粒的染色强的细胞要弱.

2.2 α 凝集素-目的蛋白表面展示系统

这是一种将目的蛋白作为 C 端与 α 凝集素 Aga2p 亚基的 N 端融合的表面展示系统.

α 凝集素通过与 α 凝集素相似的连接锚定在细胞壁上^[5]. 与 α 凝集素不同, α 凝集素由两个亚单位的糖蛋白组成. 725 个氨基酸残基的 Aga1p 亚单位通过 β 葡聚糖的共价连接而锚定在细胞壁上, 69 个氨基酸残基的 Aga2p 亚单位通过两对二硫键与 Aga1p 亚单位相连. 天然的 α 凝集素结合活性部位在 Aga2P 的 C 端, 因此, 此处代表了一个细胞外大分子的可及性区域和展示固定蛋白的有用位点.

Boder 等构建了一个将目的蛋白作为 Aga2P 的 C 端的展示载体 (图 2).

Aga2P-scFv 融合蛋白的表达由 GAL1 启动子引导, 酵母在葡萄糖培养基中生长使得 GAL1 启动子的转录被完全抑制, 将细胞转入含半乳糖的培养基中诱导产生 Aga1P 和 Aga2p 融合基因产物, 经相关的分泌途径被转移到细胞表面.

表面展示的 Aga2p-scFv 融合蛋白已通过共聚焦显微镜及流式细胞仪得到证实. 同时用 c-myc 单

抗和荧光素偶联的 dextran (FITC-dextran) 标记的细胞可用激光扫描共聚焦显微镜检测. 而携带无关多肽载体的对照细胞则未被 c-myc 或 FITC-dextran 标记. 相反, 携带表达 Aga2p-scFv-c-myc 融合蛋白的表面展示载体细胞可被抗 c-myc 和 FITC-dextran 两种抗体共同标记, 表明抗原结合位点对于非常大的分子是易接近的.

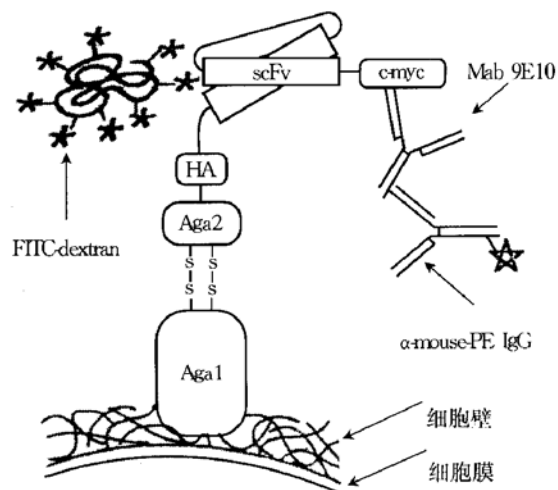


Fig. 2 Schematic illustration of yeast surface display system of α agglutinin-scFv

图 2 α 凝集素-目的蛋白表面展示系统图解

3 酵母表面展示系统的特点

通常被选的表面展示系统应该满足几个条件. 首先, 表达偏差应该是最小的, 以便 DNA 库的多样性可被正确折叠蛋白质的多样性所代表. 其次要有定量筛选的标准. 最后, 被选系统应该能很好地区分仅有微弱亲和力差别的突变体^[10,11].

噬菌体展示技术的一个重要限制是其对于真核蛋白质的表达存在不可预测的表达偏差, 因为噬菌体颗粒上的融合蛋白表达正确与否主要依赖于大肠杆菌表达可溶性蛋白质的能力, 而大肠杆菌表达含有二硫键的哺乳动物蛋白的能力很有限, 因其缺乏在内质网内对蛋白质有效折叠所需的折叠酶和分子伴侣. 酿酒酵母的蛋白质折叠和分泌机制与哺乳动物细胞非常相似, 因而比原核细胞更有可能正确表达和展示人的蛋白质. 作为遗传学上一种易于培养的单细胞微生物, 在构建库方面酵母又比哺乳动物细胞更合适 (例如在研究蛋白质的相互关系方面已经被广泛应用于的酵母双杂交系统^[12]).

不象噬菌体, 酵母是个足够大的颗粒, 可用流式细胞仪进行筛选和分离, 这就使得基于特异的定

量的亲和力改变的突变体分离成为可能^[10,11].

为了检测酵母展示对于区分仅有微弱亲和力差别的抗体的能力, van Antwerp 等^[10]将 D1.3, 一个小鼠抗鸡卵溶菌酶的单抗, 与 M3, D1.3 的较高亲和力的突变体 (2 倍) 的 scFvs 均克隆到酵母展示系统. 表达较高 M3 抗体亲和力的酵母细胞以 1:1000 的比例与表达野生型 D1.3 抗体的细胞混合. 运用荧光抗体标记和流式细胞仪分拣技术从混合物中收集最高亲和力的细胞. 单轮富集为 125 倍. 表明酵母展示技术能很好地区分微弱亲和力差别的突变体.

4 酵母表面展示系统的应用

目前, 展示技术被广泛用于蛋白质分子的相互识别、定向进化以及新型疫苗的研制等方面^[9].

4.1 蛋白质的定向进化

酵母表面展示系统用于蛋白质亲和力和稳定性的定向进化已有成功报道, 最先被用于抗体的亲和力成熟^[5,13].

Kieke^[14,15]和 Holler 等^[16]利用此技术对 TCR 进行了直接的体外进化. TCR 的结构与抗体相似, 但是用其他展示系统对其进行的定向进化一直没有成功. Kieke 等最先在酵母表面成功地展示了 TCR, 并获得酵母展示的 TCR 突变体库. 从中筛选到与天然 TCR 不同的突变体, 亲和力和热稳定性均提高. 在此基础上, Holler 等构建了一个 α CDR3 突变体库 (5 个氨基酸残基突变, 库容为 20^5), 并将此库用酵母进行展示, 从中筛选到几个对肽/MHC 高亲和力的突变体. 这些突变体保留了对肽高度特异性, 同时亲和力提高了约 100 倍. Shusta^[17]以相同的方法从酵母展示的 TCR 突变体库中筛选到能抵抗热变性的 scTCRs 突变体, 65℃ 稳定性超过 1 h, 并保留了特异的肽/MHC 复合物配体和细菌超抗原的结合能力.

4.2 活的口服疫苗

在细胞表面表达的蛋白质易于接近抗体, 因此, 可被免疫系统识别, 即使很小的肽, 当展示在细胞表面时, 也具有免疫原性. 因而可通过在酵母表面表达异质性的抗原蛋白来发展疫苗.

Schreuder 等^[9]将乙肝病毒表面抗原 (HBsAg) 的两个主要亲水片段与 α -凝集素 C 端融合表达在酿酒酵母表面. 此融合蛋白含有 preS 序列的大部分和部分 S 序列. 应用这些细胞在小鼠腹腔内免疫检测到滴度低, 但特异性高的抗 HBsAg 抗体. 作

者认为增加表面表达蛋白的数量可提高其抗原性, 有可能成为廉价、安全的口服疫苗.

4.3 其他应用

由于酵母展示的蛋白质是紧密锚固在细胞壁上, 可以耐受 SDS 等的抽提. 同时酵母有发酵特性, 生长快, 因此在工业上具有很好的应用前景. 例如, 将不同特异的金属结合蛋白表达在酵母表面, 产生的环境进化微生物, 可用于废水处理中吸附金属离子和放射性物质^[18,19]. 将具有催化活性的酶固定在酵母细胞壁上, 可防止酶的不可逆抑制, 再生酶的活性^[8].

表面展示技术日新月异, 酵母展示系统也在不断地完善和改进, 在多个领域得到广泛应用. 由于其是真核细胞展示系统, 对于哺乳动物蛋白质, 尤其是人的蛋白质的展示具有独特的优越性, 相信随着此技术的不断完善, 在蛋白质分子的研究方面会发挥越来越重要的作用.

参 考 文 献

- 1 Moriki T, Kuwabara I, Liu F T, *et al.* Protein domain mapping by lambda phage display: the minimal lactose binding domain of galectin 3. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **265** (2): 291~296
- 2 Efimov V P, Nepluev I V, Mesyanzhinov V V. Bacteriophage T4 as a surface display vector. *Virus Genes*, 1995, **10** (2): 173~177
- 3 Lattemann C T, Maurer J, Gerland E, *et al.* Autodisplay: functional display of active beta-lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. *J Bacteriol*, 2000, **182** (13): 3726~3733
- 4 Ernst W J, Spenger A, Toellner L, *et al.* Expanding baculovirus surface display: Modification of the native coat protein gp64 of *Autographa californica* NPV. *Eur J Biochem*, 2000, **267** (13): 4033~4039
- 5 Boder E T, Wittrup K D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol*, 1997, **15** (6): 553~557
- 6 de Nobel J G, Klis F M, Priem J, *et al.* The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1990, **6** (6): 491~499
- 7 Lu C F, Montijn R C, Brown J L, *et al.* Glycosyl phosphatidylinositol dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1, 6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Cell Biol*, 1995, **128** (3): 333~340
- 8 Schreuder M P, Brekelmans S, van den Ende H, *et al.* Targeting of a heterologous protein to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1993, **9** (4): 399~409
- 9 Schreuder M P, Deen C, Boersma W J, *et al.* Yeast expressing hepatitis B virus surface antigen determinants on its surface: implications for a possible oral vaccine. *Vaccine*, 1996, **14** (5): 383~388
- 10 van Antwerp J J, Wittrup K D. Fine affinity discrimination by yeast surface display and flow cytometry. *Biotechnol Prog*, 2000, **16** (1): 31~37

- 11 Boder E T, Wittrup K D. Optimal screening of surface-displayed polypeptide libraries. *Biotechnol Prog*, 1998, **14** (1): 55~ 62
- 12 Legrain P, Selig L. Genome-wide protein interaction maps using two-hybrid systems. *FEBS Lett*, 2000, **480** (1): 32~ 36
- 13 Kieke M C, Cho B K, Boder E T, *et al.* Isolation of anti-T cell receptor scFv mutants by yeast surface display. *Protein Eng*, 1997, **10** (11): 1303~ 1310
- 14 Kieke M C, Shusta E V, Boder E T, *et al.* Selection of functional T cell receptor mutants from a yeast surface-display library. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (10): 5651~ 5656
- 15 Shusta E V, Kieke M C, Parke E, *et al.* Yeast polypeptide fusion surface display levels predict thermal stability and soluble secretion efficiency. *J Mol Biol*, 1999, **292** (5): 949~ 956
- 16 Holler P D, Holman P O, Shusta E V, *et al.* *In vitro* evolution of a T cell receptor with high affinity for peptide/MHC. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (10): 5387~ 5392
- 17 Shusta E V, Holler P D, Kieke M C, *et al.* Directed evolution of a stable scaffold for T-cell receptor engineering. *Nat Biotechnol*, 2000, **18** (7): 754~ 759
- 18 Ramsay L M, Gadd G M. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, **152** (2): 293~ 298
- 19 Gadd G M. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, **11** (3): 271~ 279

Progress in Yeast Surface Display System^{*}

GUO Bo^{**}, XIE Pei-Rong, ZOU Qiang, ZHENG Ping

(Department of Immunology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Yeast surface display system had been developed greatly since the phage display was invented. It is well suitable for displaying mammalian cell-surface and secreted proteins that require endoplasmic reticulum-specific post translational processing for efficient folding and activity. Yeast cells are large enough particles, unlike phage, that can be screened and separated using flow cytometer. Yeast adhesion receptor, a agglutinin or α agglutinin, have been used as a surface display scaffold. Yeast surface display has been successfully applied in protein directed evolution and alive oral vaccines.

Key words yeast surface display, *Saccharomyces cerevisiae*, directed evolution, oral vaccines

^{*} This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (30080032).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-23-68752238, E-mail: immuno06@mail.tmmu.com.cn

Received: April 2, 2001 Accepted: May 17, 2001