

## 酵母启动子和外源基因的表达

陆 德 如

(中国科学院微生物研究所, 北京)

以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)及其基因运载体作为遗传工程的表达系统,有以下优点<sup>[1,2]</sup>。

1. 利用酵母酿酒和发酵食品已有几千年历史,用它生产的产品人们易于接受,近代医学生物学也证明它不含毒素,不会引起任何疾病。

2. 它是一种真核生物,遗传密码的使用方式与高等生物相似,能较好地表达真核生物的基因。

3. 有些酵母的蛋白能分泌到胞外,在分泌过程中可将最初合成的蛋白原的先导序列切除和糖基化,使之成为更稳定的活性蛋白;而且蛋白的分泌,还可避免由于蛋白过量积累所引起的毒害作用和所合成蛋白被胞内蛋白酶的水解。另外,分泌到胞外的蛋白也便于提取和纯化。

4. 由于近年来对酵母的遗传学和分子生物学进行了大量研究,也为它的遗传工程研究创造了十分有利的条件。此外,酵母的发酵工艺现已相当完善,用它进行大规模工业生产十分方便。

所以,近年来人们十分重视酵母基因表达系统的研究,并且已成为当前遗传工程研究的一个重要方面。研究工作也进展很快,现在许多酵母基因启动子已经克隆出来,并已用它们构建成了各种表达运载体<sup>[2]</sup>。这些基因包括醇脱氢酶基因(ADC)、三磷酸甘油醛脱氢酶基因(GAP)、磷酸甘油激酶基因(PGK)、烯醇

酶基因(ENO)、蔗糖酶基因(SUC)、半乳糖降解酶基因(GAL)、酸性磷酸酶基因(PHO)、 $\alpha$ 因子基因等。在应用方面<sup>[1]</sup>,也已成功地将人干扰素基因、免疫球蛋白基因、乙型肝炎病毒表面抗原基因、人表皮生长激素基因、内啡肽基因、降钙素基因和小牛凝乳酶基因在酵母中得到了表达。值得注意的是,在酵母中表达的乙型肝炎病毒表面抗原能象在人体细胞中那样形成有结构的颗粒<sup>[3]</sup>,免疫球蛋白的轻链和重链在酵母细胞中能组装成有生物活性的抗体<sup>[4]</sup>,这是大肠杆菌系统所不能达到的。

酵母启动子的研究<sup>[5]</sup>,目前主要是研究RNA多聚酶II的启动子,因大多数信使RNA是由它所合成的。据初步研究,这种启动子基本由以下几种序列所组成。

TATA序列和CAAT序列; Dobson比较了十七种不同基因启动子序列后,发现所有这些基因的转录起始点上游25—35碱基对处都有一段TATA序列,部分基因在起始点上游80碱基对处还有一段CAAT序列。这与其它真核生物启动子相似。

上游激活序列<sup>[6]</sup>(UAS, Upstream Activation Sequence):一般位于转录起始点上游几十至数百碱基对处,它有激活转录作用,但与哺乳动物中的增强因子不完全相同。

用基因融合和缺失研究也表明<sup>[2]</sup>,上述序列与转录有密切关系,例如当用大

肠杆菌 $\beta$ -半乳糖苷酶基因 (*lacZ*) 与不同基因的上述序列融合时, 杂合蛋白除具有 $\beta$ -半乳糖苷酶活性外, 还受它所融合的酵母启动子的控制。

正象其它微生物一样, 酵母中不同基因的调控方式也是不同的<sup>[2]</sup>。由于酿酒酵母是经过长期选择得到的发酵能力很强的酵母, 所以其酵解酶的量可达细胞总蛋白的0.5—5%。现在证明这些酵解酶基因表达都是组成型的, 即在任何生理条件下这些基因总是表达的, 有的甚至水平很高。通常这些基因启动子可用来构建高效表达运载体, 现在常用的PGK载体就是其中之一。与此相反, 与降解糖(葡萄糖除外)有关酶的基因都是诱导型, 例如半乳糖降解酶的合成是严格地受半乳糖诱导的, 如果在没有半乳糖的条件下, 几乎不能测出这些酶的活性, 而在半乳糖诱导下其酶蛋白可达细胞总蛋白的1%。据最近的研究知道, 这种调控与UAS序列有关<sup>[7]</sup>, 首先从遗传分析发现, 与半乳糖降解有关的酶基因表达中, GAL 4的基因产物是GAL 1、GAL 7和GAL 10基因表达所必须的, 而GAL 4基因只有在半乳糖存在下才能表达。另外, 从DNA序列分析表明, GAL 1和GAL 10基因中的TATA序列上游200—300碱基对处, 存在着一段100碱基对长的UAS序列。当这个序列用内切酶切下后, 在离体条件下能与GAL 4的基因产物相结合, 而且只有在半乳糖存在下才能结合。由此可看出, UAS在基因调控中直接与调控蛋白起作用。这两种调控方式在应用上各有优点, 组成型可使基因表达保持在较高水平上, 从而可大量得到基因产物。但有些基因产物对细胞是有毒害作用的。产物的积累会引起细胞停止生长或死亡, 最终不能得到大量基因产物。而用诱导型可克服这个缺点, 即采取

先将酵母大量生长, 然后加诱导物诱导的办法使产生所需的基因产物, 这样最后也能得到大量产物, 例如Kramer<sup>[8]</sup>利用酸性磷酸酶基因(Pho)的表达受无机磷浓度控制的特点, 在Pho基因启动子后加入一个干扰素基因, 这样, 只要控制无机磷的浓度就可控制干扰素的产量。

酵母蛋白质分泌系统也是当前研究的重要方面。根据蔗糖酶基因、 $\alpha$ 因子基因的研究知道<sup>[9]</sup>, 酵母分泌蛋白质的机制基本与哺乳动物细胞相同。其过程是这样的, 先在内质网内合成前蛋白原(例如前胰岛素原、前 $\alpha$ 因子原), 一般该前蛋白原的N端常带有20个左右疏水氨基酸组成的前导序列和由亲水氨基酸组成的能进行糖基化的序列, 接着依次转运到高尔基体和分泌囊中将前导序列切除。最后分泌到质膜。实验证明, 酵母不仅能识别本身蛋白的前导序列, 而且还能识别哺乳动物蛋白的前导序列, 从而将合成的哺乳动物蛋白分泌到胞外。Hitzeman<sup>[10]</sup>等人就利用干扰素本身的前导序列使酵母将干扰素分泌到胞外。但是, 并不是每一个基因都带有前导序列密码的, 所以要使任何一种克隆基因产物都能分泌到胞外, 必须构建一个能普遍适用的分泌运载体。利用 $\alpha$ 因子基因的启动子和前导序列密码所构建的运载体是目前较好的一种分泌运载体<sup>[11]</sup>, 它能表达和有效地分泌分子量不同的各种蛋白, 如内啡肽、降钙素、干扰素等。

酵母能否剪接信使RNA, 在外源基因表达中也很重要, 如果它能切除外源真核基因中的内含子, 我们就可直接利用酵母来表达从染色体克隆的真核基因。但一些实验表明<sup>[6]</sup>, 虽然酵母的一些基因有内含子, 并能将它们切除, 但不能切除其它真核生物的内含子, 所以上述想法并不现

实。不过,这不影响利用 cDNA 克隆的基因表达。

当前,酵母分子生物学研究进展很快,新的研究结果层出不穷。今年初,美国冷泉港实验室以 Wigler<sup>[11]</sup> 为首的小组报道了肿瘤基因也能在酵母中表达,并能

互补酵母的分化功能。最近,麻省理工学院 Fink<sup>[12]</sup> 等人报道了酵母转座子 Ty 的转座是通过反转录酶进行的。这些都是激动人心的发现。可以预期,这些发现对扩大酵母在生物工程中的应用将发生重大影响。

### 参 考 文 献

- [1] Bitter, G. A. et al.: The World Biotech Report, Vol. 2, Online, 1984, pp. 381—391.
- [2] Broach, J. R. et al.: Experimental Manipulation of Gene Expression, Academic Press, 1983. pp. 83—117.
- [3] Valenzuela, P. et al.: *Nature*, 298: 347—350, 1982.
- [4] Wood, C. R. et al.: *Nature*, 314: 446—449, 1985.
- [5] Old, R. W. et al.: Principles of Gene Manipulation, 183—201, Blackwell Scientific Publication 1985.
- [6] Guarente, L.: *Cell*, 36: 799—800, 1984.
- [7] Bram, R. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*, 82: 43—47, 1985.
- [8] Kramer, R. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 367—370, 1984.
- [9] Julius, D. et al.: *Cell*, 36: 309—319, 1984.
- [10] Hitzeman, R. A. et al.: *Science*, 219: 620—625, 1983.
- [11] Katsoka, T. et al.: *Cell*, 40: 19—26, 1985.
- [12] Boeke, J. D. et al.: *Cell*, 40: 491—500, 1985.