

甾醇 C-24 甲基转移酶基因在酿酒酵母中的内源表达及工程菌麦角甾醇的合成

孟云霞^{1,2}, 何秀萍¹, 刘楠¹, 郭雪娜¹, 张博润¹

1 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

2 中国科学院研究生院, 北京 100039

摘要: 通过高保真 PCR 克隆到含酿酒酵母甾醇 C-24 甲基转移酶基因编码序列及终止子序列的 DNA 片段 *ERG6*, 以大肠杆菌-酿酒酵母穿梭质粒 YEp352 为载体, 磷酸甘油酸激酶基因 *PGK1* 启动子为上游调控元件构建了酵母菌表达质粒 pPERG6。通过同源重组, 以铜离子螯合蛋白基因 *CUP1* 替换染色体上 *ERG6* 基因内部序列获得 *ERG6* 破坏菌株 YS58-*erg6*, 其中麦角甾醇的合成被阻断, 同时细胞的生长也受到明显抑制。表达质粒 pPERG6 转化破坏菌株 YS58-*erg6* 后, 不但使细胞恢复了合成麦角甾醇的能力, 细胞生物量也得到明显提高, 这说明表达质粒上的 *ERG6* 基因得到了功能性的表达。分别用载体质粒 YEp352 和表达质粒 pPERG6 转化酿酒酵母单倍体菌株 YS58, 获得对照菌株 YS58(YEp352) 和重组菌株 YS58(pPERG6)。重组菌株 YS58(pPERG6) 生物量和麦角甾醇含量分别是对照菌 YS58(YEp352) 的 1.23 和 1.32 倍。可见甾醇 C-24 甲基转移酶基因的高表达可以增强酵母细胞麦角甾醇的合成能力。

关键词: 酿酒酵母, 甾醇 C-24 甲基转移酶, 高表达, 麦角甾醇

Endogenesis Expression of Sterol C-24 Methyltransferase Increases Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*

Yunxia Meng^{1,2}, Xiuping He¹, Nan Liu¹, Xuena Guo¹, and Borun Zhang¹

1 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract: Ergosterol is economically important as the precursor of vitamin D₂ and the main material to produce steroid drugs. The biosynthesis of sterols in yeast is complex. *ERG6* gene encodes the sterol C-24 methyltransferase catalyzing the fifteenth reaction in ergosterol biosynthesis. In this study, *ERG6* gene was cloned from *Saccharomyces cerevisiae* YSF-20 by PCR. To express *ERG6* gene properly in *S. cerevisiae*, expression plasmid pPERG6 containing *ERG6* under the control of *PGK1* promoter was constructed and then introduced into *S. cerevisiae* YS58 to generate recombinant strain YS58(pPERG6). Results of *ERG6* disruption and complementation showed that the *ERG6* gene on plasmid pPERG6 expressed functionally in *S. cerevisiae*. The ergosterol content in re-

Received: April 13, 2007; Accepted: May 24, 2007

Supported by: the National Natural Foundation of China (No. 30470035).

Corresponding author: Borun Zhang. Tel: +86-10-64807427; Fax: +86-10-64807427; E-mail: zhangbr@sun.im.ac.cn

Xiuping He. Tel: +86-10-64807356; Fax: +86-10-64807356; E-mail: hexp@sun.im.ac.cn

国家自然科学基金(No. 30470035)资助。

combinant strains YS58(pPERG6) was 1.32 times of that in the control strain YS58(YEp352), and at the same time, the biomass of the recombinant strain was 1.23 times of that of the control strain. Results in this study showed that the internal expression of *ERG6* gene enhanced the ergosterol biosynthesis in yeast.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, sterol C-24 methyltransferase, expression, ergosterol

麦角甾醇是真菌细胞膜的重要组成成分, 在细胞内起着各方面的生理功能。另外它还是维生素 D₂ 的前体和生产甾醇类药物的重要原料。最近有文献报道维生素 D 及甾醇类药物具有预防和治疗多种癌症的功效, 另外维生素 D 还可以预防心脏病、高血压、精神分裂症等^[1]。维生素 D 族化合物可能是未来很有希望的抗癌药物^[2]。因此麦角甾醇是一种具有重要经济价值的代谢物。

麦角甾醇的生物合成是一个多酶催化的复杂过程, 属于甲羟戊酸途径的一个特定分支。在酵母菌中麦角甾醇的生物合成至少涉及到 23 步反应和 25 个结构基因^[3]。相关基因在转录水平的调控是麦角甾醇合成调控的主要方面, 而且这种调控还与甾醇的反馈作用有关, 在部分基因的调控序列中含有甾醇水平应答元件^[4]。因此通过基因工程手段解除转录调控可能是改变甾醇合成和细胞内甾醇组分的有效途径。但由于各反应在整个代谢途径中的位置不同, 因此相关基因高效表达后产生的效应也各不相同^[5-8]。研究各基因高效表达后对细胞甾醇合成的影响, 从而确定合成途径中的限速步骤, 不但有利于全面阐述甾醇化合物生物合成的调控机制, 同时将为通过基因组合表达构建麦角甾醇高产菌株提供重要的理论依据。

ERG6 基因编码的甾醇 C-24 甲基转移酶催化麦角甾醇合成途径中的第 15 步反应^[9], 即在酵母甾醇侧链的 C-24 位引入一个甲基, 形成麦角甾醇。此反应只在麦角甾醇合成途径中存在, 而动物和植物甾醇合成途径中并没有该甲基化反应。该基因已被克隆和测序^[10]。本文报道了 *ERG6* 表达对酵母菌麦角甾醇合成的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)YS58(*MATa leu2 his3 trp3 ura3*)^[11], 酿酒酵母(*Saccharomyces*

cerevisiae)YSF-20, 大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α , 质粒 YEp352(*amp, URA3, Yeast-E.coli* 穿梭载体), pVC727-6^[12], pBluescriptM13, pMCUP1^[13]均由本试验室保存。

1.1.2 培养基

酵母菌保存和培养用 YEPD 培养基, 酵母重组菌株筛选用含有色氨酸、亮氨酸和组氨酸的基本培养基 SC 均按文献^[14]配制。大肠杆菌 DH5 α 保存和培养用 LB 培养基, 筛选大肠杆菌转化子用含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基均按文献^[15]配制。

1.1.3 酶、抗生素和化学试剂

实验所用限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶均为宝生物工程(大连)有限公司产品, *Pfu* Mix 购于天根生化科技(北京)有限公司技术, 麦角甾醇购于 Sigma 公司, 溶菌酶、RNase 和氨苄青霉素购自华美生物工程有限公司, 硫酸铜购于北京化学试剂公司, X-gal 和 IPTG 购于上海生工生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 操作

酵母菌染色体 DNA 的制备参照文献^[14]进行。DNA 酶切和连接参照产品说明进行。大肠杆菌转化和质粒提取参照文献^[15]进行。

1.2.2 引物设计与 PCR 扩增

根据 GenBank 中报道的酿酒酵母 *ERG6* 基因的核苷酸序列设计了引物: P6-L: 5'-GGAGAATTC-GTAGGCATAAGATGAG-3' 和 P6-R: 5'-GCCAA-GCTTTGTAACGAGAGTATCCACT-3', 引物 P6-L 和 P6-R 的 5' 端分别加入了 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点。以酿酒酵母 YFS-20 的染色体 DNA 为模板, 用高保真的 *Pfu* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。50 μL 反应体系中含 0.6 μg 模板 DNA, 0.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 引物对, 25 μL *Pfu* Mix, 用去离子水补充体积到 50 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 29 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 循环一次。由引物对 P6-L / P6-R 扩增出含甾醇 C-24 甲基

转移酶基因编码序列及下游终止子序列的 DNA 片段, 命名为 *ERG6*。PCR 产物按文献[15]方法纯化回收。

1.2.3 酵母菌的转化和转化子的筛选

酵母菌的转化参照文献[14]进行。在含有色氨酸、亮氨酸和组氨酸的 SC 培养基上筛选重组菌株; 破坏菌株用含有硫酸铜的 YEPD 培养基筛选。

1.2.4 麦角甾醇的提取和测定

麦角甾醇的提取和测定参见文献[16]。生物量为每升培养物中菌体的干重(g/L), 麦角甾醇含量为每克干细胞中麦角甾醇的毫克数(mg/g)。

1.2.5 重组菌株的遗传稳定性检测

将待测菌在 YEPD 斜面上活化, 然后转接到 2.5 mL YEPD 培养基中(没有选择压力), 28℃培养, 每

24 h 转接 1 次, 共转接 5 次后, 取菌液涂布 YEPD 平板, 28℃培养至长出单菌落。分别挑取 100 个单菌落于无菌水中, 饥饿 4 h 后, 分别接种在不同的检测培养基上, 28℃培养 48 h, 记录单菌落在不同培养基上的生长情况。

2 结果

2.1 酵母菌重组表达质粒的构建

以酿酒酵母 YSF-20 的总 DNA 为模板, PCR 扩增到 1.6 kb 含甾醇 C-24 甲基转移酶基因编码序列和终止子序列的 DNA 片段 *ERG6*。EcoR I 和 Hind III 酶切 PCR 产物, 并与相同酶切的 YEp352 进行连接, 获得重组质粒 pERG6(图 1)。序列分析表明克隆到的

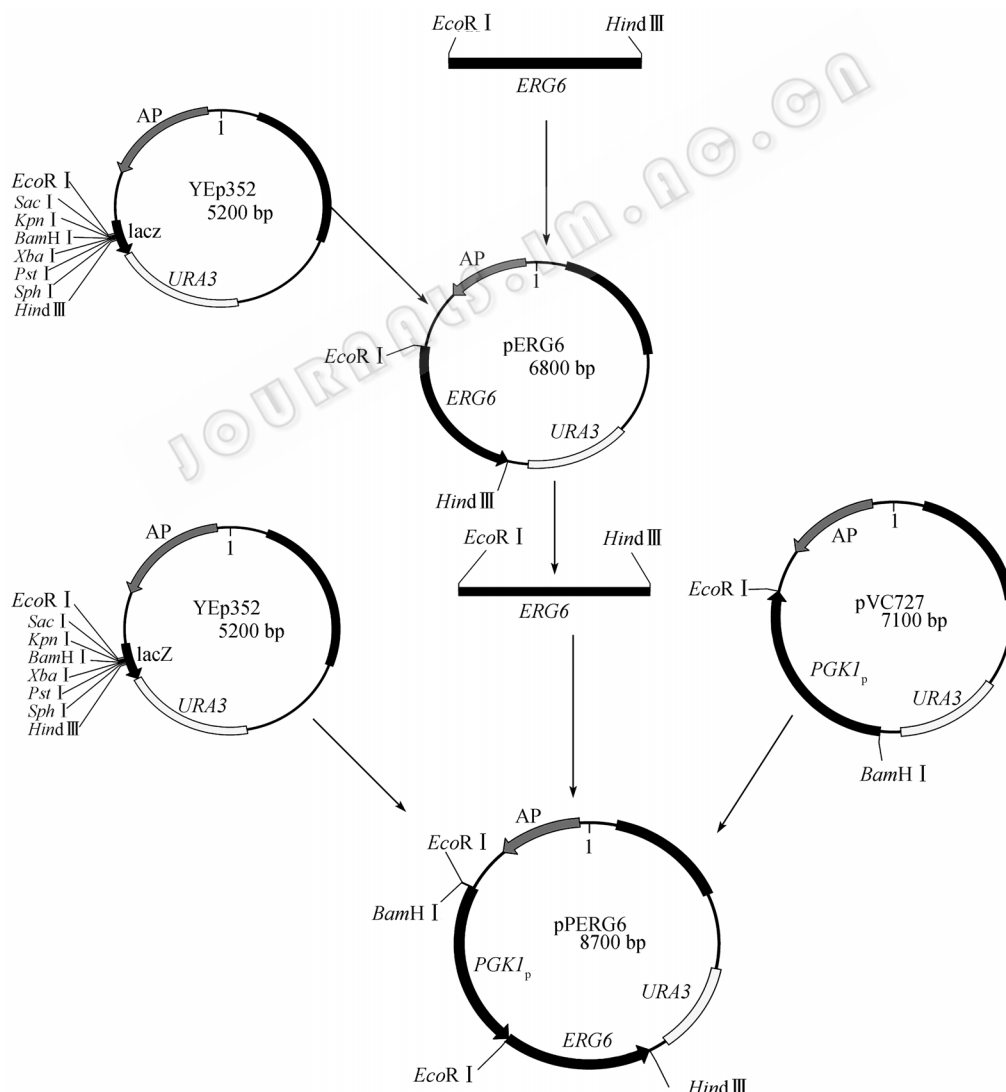


图 1 重组表达质粒 pPERG6 的构建
Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pPERG6

ERG6 基因与 GenBank 中报道的序列一致性为 100%。

用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切质粒 pVC727-6, 回收 1.9 kb 含 *PGK1* 启动子的 DNA 片段, 用 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切质粒 p*ERG6*, 获得 1.6 kb 的 *ERG6*。 *PGK1* 启动子和 *ERG6* 与经 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切的 YEp352 进行连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 获得重组质粒 pPERG6 (图 1)。酶切分析验证了质粒构建的正确性。

2.2 *ERG6* 基因的破坏和互补

用铜抗性基因 *CUP1*, 取代质粒 p*ERG6* 上 *ERG6* 基因内部 100 bp 的 DNA 片段, 得到 *ERG6* 破坏质粒 pMCE6。用 *Sca* I 和 *Hind* III 酶切 pMCE6, 得到一个 2.4 kb 两端分别是 *ERG6* 基因的 5'端和 3'端序列, 中间为 *CUP1* 的 DNA 片段。用该片段转化酿酒酵母 YS58。使其与染色体上的 *ERG6* 发生双交换同源重组(图 2)。通过细胞对硫酸铜的抗性筛选到破坏菌株 YS58-*erg6*。用 *ERG6* 基因两端引物进行 PCR 扩增, 从 YS58 染色体上扩增出 1.6 kb DNA 片段, 从 YS58-*erg6* 染色体上扩增出 2.4 kb 的片段(图 3), 说

明在菌株 YS58-*erg6* 的染色体上 *ERG6* 基因内部插入了 *CUP1* 基因。对细胞生长和甾醇含量分析, 发现 *ERG6* 破坏菌株中麦角甾醇的合成被阻断, 同时细胞的生长明显受到抑制, 生物量只有野生型菌株的 45%(表 1)。

用构建的酵母表达型质粒 pPERG6 转化破坏菌株 YS58-*erg6*, 通过营养缺陷互补筛选到互补转化子, 命名为 YSM6。甾醇组分和含量测定表明互补转化子 YSM6 恢复了麦角甾醇合成能力, 同时细胞生物量也明显提高(表 1)。表明表达质粒 pPERG6 上的 *ERG6* 基因得到了功能性表达。

2.3 *ERG6* 基因表达对酿酒酵母麦角甾醇合成的影响

用空载体 YEp352 和表达质粒 pPER6 转化酿酒酵母单倍体菌株 YS58, 通过营养缺陷互补, 在含有亮氨酸、组氨酸和色氨酸的 SC 培养基上筛选到转化子。遗传稳定性分析表明在无选择压力下, 连续传代培养 5d, 重组质粒在细胞内能稳定遗传。对重组菌株 YS58(pPERG6)及对照菌株 YS58(YEp352)甾醇含量进行测定和显著性分析, 结果发现与对照菌

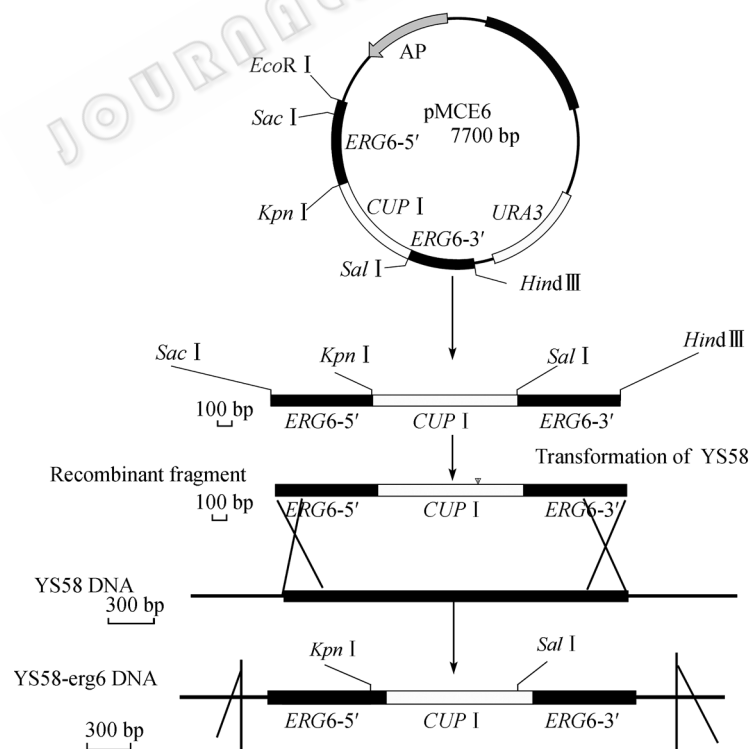


图 2 *ERG6* 破坏菌株 YS58-*erg6* 的构建
Fig. 2 Construction of disruptant strain YS58-*erg6*

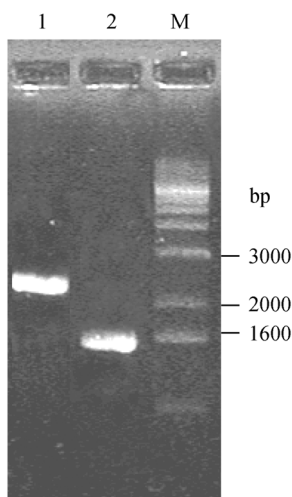
图3 破坏菌株 YS58-*erg6* 的 PCR 分析Fig. 3 PCR analysis of disruptant strain YS58-*erg6*1: YS58-*erg6* DNA; 2: YS58 DNA; M: marker D015-22表1 *ERG6* 基因破坏菌株、互补菌株及对照菌中麦角甾醇含量和细胞生物量比较

Table 1 Comparison of ergosterol content and biomass among the referring strain, disruptant strain and complementation strain

Strains	Biomass (g/L)	Total sterol content (mg/g)	Ergosterol con- tent (mg/g)
YS58	5.6	13.2	7.85
YS58- <i>erg6</i>	2.5	4.7	ND*
YSM6	7.9	14.8	9.10

*ND, Not detectable. The referring strain YS58, disruptant strain YS58-*erg6*, complementation strain YSM6 were cultured in YEPD at 28°C for 36 h. Values represent the means of three experiments.

YS58(YEp352)相比, 含高拷贝 *ERG6* 基因表达框的重组菌株 YS58(pPERG6)的总甾醇和麦角甾醇含量有明显升高。

为了进一步验证 *ERG6* 基因表达对细胞麦角甾醇合成的影响, 检测了不同培养时间细胞的生物量和麦角甾醇含量。结果发现, 在检测的时间范围内, *ERG6* 基因表达菌株 YS58(pPERG6)中麦角甾醇含量始终比对照菌株 YS58(YEp352)高, 约为对照菌株的 1.32 倍; 同时细胞生物量也明显提高, 是对照菌株的 1.23 倍(图 4)。因此 *ERG6* 的表达对酵母细胞麦角甾醇的生物合成产生了正调控作用, 使酵母细胞麦角甾醇合成能力增强。

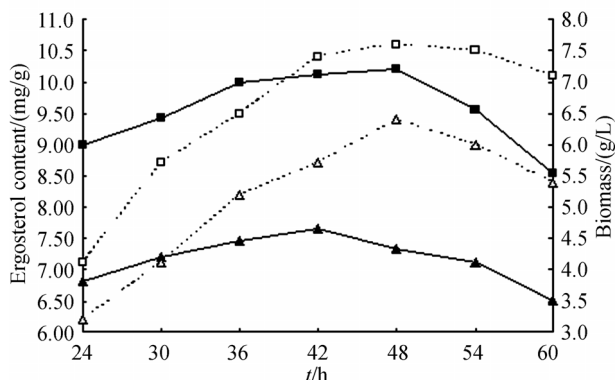


图4 培养时间对酵母细胞麦角甾醇含量和生物量的影响

Fig. 4 Effect of incubation time on the ergosterol content and biomass of recombinant and the control strains

YS58(YEp352)--(Biomass Δ , Ergosterol \blacktriangle);
YS58(pPERG6)--(Biomass \square , Ergosterol \blacksquare)

3 讨论

麦角甾醇不仅是真菌细胞膜结构的重要组成部分, 同时也是重要的医药化工原料, 具有非常广阔的应用前景。酵母菌发酵是生产麦角甾醇的主要方法, 利用现代生物技术提高酵母细胞麦角甾醇合成能力是提高麦角甾醇生产水平, 降低生产成本的新的研究思路, 是目前国内外研究的热点。酵母菌中麦角甾醇的生物合成受到严格的调控, 而且这种调控作用主要发生在相关基因的转录水平, 因此通过基因工程技术解除转录水平的调控, 使催化特定反应的酶高效表达可能是改变细胞内甾醇生物合成代谢流的有效途径。但由于甾醇生物合成的复杂性, 代谢途径中不同位点酶活性的提高对麦角甾醇合成的影响也是不同的。根据编码酶活性提高后对细胞麦角甾醇合成能力影响的不同, 可以将麦角甾醇合成基因分为三类, 使细胞麦角甾醇含量提高的正效应基因; 使细胞麦角甾醇含量降低的负效应基因, 及对细胞麦角甾醇含量没有影响的零效应基因。

本研究利用酿酒酵母强效启动子实现 *ERG6* 基因的表达, 结果发现提高甾醇 C-24 甲基转移酶活性增强了细胞合成麦角甾醇的能力, 同时也刺激了细胞的生长。*ERG6* 表达后对细胞生长的刺激作用一方面是由于非甲基化的中间体甾醇含量降低, 具有激素功能的麦角甾醇含量的升高; 另一方面是由于甲基供体——S-腺苷甲硫氨酸水平的降低。因为在甾

醇 C-24 甲基转移酶活性缺失菌株中, 非甲基化甾醇和 S-腺苷甲硫氨酸的积累对细胞产生了多种不利的影 响, 如细胞膜的通透性增大, 细胞耐渗透能力降低, 对环境的耐受力减弱等^[17]。因此甾醇 C-24 甲基转移酶编码基因 *ERG6* 是一个正向效应基因, 通过它与其他基因的高效共表达将有望进一步提高细胞合成麦角甾醇的能力 从而为构建具有工业应用价值的麦角甾醇高产菌株奠定重要基础。

REFERENCES

- [1] Lin YC, Li HJ, Jiang GC, *et al.* A novel gamma-lactone, eutypoid-A and other metabolites from marine fungus *Eutypa sp.*(#424) from the South China Sea. *Indian Journal of Chemistry*(Section B), 2002, **41**(7): 1542-1544.
- [2] Desjeux P, Piot B, O'Neill K, *et al.* Co-infections of leishmania/HIV in south Europe. *Med Trop*, 2003, **61**: 187-193.
- [3] Lees ND, Bard M, Kisch DR. Biochemistry and molecular biology of sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1999, **34**(1): 33-47.
- [4] Leber R, Zenz R, Schrottner K, *et al.* A novel sequence element is involved in the transcriptional regulation of expression of the *ERG1* (squalene epoxidase) gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 2001, **268**(4): 914-924.
- [5] He X, Zhang B, Tan H. Overexpression of a sterol C-24(28) reductase increases ergosterol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 2003, **25**(10): 773-778.
- [6] Cai PL, He XP, Liu N, *et al.* Effect of overexpression of sterol C-22 desaturase on ergosterol production in yeast strain. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, **47**(2): 274-279. 蔡鹏丽, 何秀萍, 刘楠, 等. 甾醇 C-22 去饱和酶基因高表达 对酵母菌麦角甾醇合成的影响. *微生物学报*, 2007, **47**(2): 274-279.
- [7] He XP, Guo XN, Zhang BR, *et al.* Effect of overexpression of sterol2acyl transferase on ergosterol production in yeast strains. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, **44**(1): 67-71. 何秀萍, 郭雪娜, 张博润, 等. 甾醇酰基转移酶基因高表达 对酵母菌麦角甾醇合成的影响. *微生物学报*, 2004, **44**(1):67-71.
- [8] Tsay YH, Robinson GW. Cloning and characterization of *ERG8*, an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes phosphomevalonate kinase. *Mol Cell Biol*, 1991, **11**(2): 620-632.
- [9] Jensen-Pergakes KL, Kennedy MA, Lees ND, *et al.* Sequencing, disruption, and characterization of the *Candida albicans* sterol methyltransferase (*ERG6*) gene: drug susceptibility studies in *erg6* mutants. *Antimicrobial Agents Chemother*, 1998, **42**: 1160-1167
- [10] Hardwick KG, Pelham HRBB. *SED6* is identical to *ERG6* and encodes a putative methyltransferase required for ergosterol biosynthesis. *Yeast*, 1994, **10**: 265-269
- [11] Teunissen ARH, Holub E, Hucht JVD. Physical localization of the flocculation gene *FLO1* on chromosome I of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1993, **9**(1): 1-10.
- [12] Liu YF, Zhu BM, Cai JK. Subcloning of *Saccharomyces cerevisiae* PGK1 promoter. *Acta Microbiologica Sinica*, 1995, **35**(1): 21-27. 刘玉方, 朱邦民, 蔡金科. 酿酒酵母 PGK1 启动子的亚克隆. *微生物学报*, 1995, **35**(1): 21-27.
- [13] Zhang JN, He XP, Liu N, *et al.* Genetically modified industrial brewing yeast with high-glutathione and low-diacetyl production. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, **21**(6): 942-946. 张吉娜, 何秀萍, 刘楠, 等. 低双乙酰抗老化啤酒酵母工程菌的构建. *生物工程学报*, 2005, **21**(6): 942-946.
- [14] Alison A, Daniel EG, Chris AK. *Methods in Yeast Genetics; A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- [15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [16] He X, Huai W, Tie C, *et al.* Breeding of hing ergosterol-producing yeast strains. *Ind Microbiol Biotechnol*, 2000, **25**: 39-44.
- [17] Pourshafie M, Morand S, Virion A, *et al.* Cloning of S-adenosyl-L-methionine: C-24- Δ -sterol-methyltransferase (*ERG6*) from *Leishmania donovani* and characterization of mRNAs in wild-type and amphotericin B-resistant promastigotes. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 2004, **48**: 2409-2414.

撤 稿 声 明

发表在我刊 2007 年第 6 期第 1107-1111 页的文章“大麦黄矮病毒 GAV 株系 ORF4 基因在杆状病毒-昆虫细胞系统中的表达及亚细胞定位”一文, 因署名作者对此文的发表存在异议, 提出撤稿申请, 经我刊编委会研究决定, 同意撤销该文。所有收录本刊的数据库及文摘, 也请根据本刊声明, 一并撤去此稿。