

启动子和细胞全局转录机制的定向进化在微生物代谢工程中的应用

赵心清, 姜如娇, 白凤武

大连理工大学生物科学与工程系, 大连 116024

摘要: 通过随机突变和定向选择而进行的定向进化(又称分子进化或人工进化)在改造酶的催化特性和稳定性、扩展酶的底物范围等方面具有广泛的应用。近年来, 定向进化也开始应用在对结构基因的启动子区域和具有调节功能的蛋白如转录因子等进行代谢工程改造, 并成功选育了对环境胁迫因素具有较强耐受性, 以及发酵效率提高的微生物菌种。以下着重介绍近年来启动子的定向进化, 包括启动子的强度和调节功能的分子进化, 以及细胞全局转录工程等技术微生物代谢工程中的应用, 这些定向进化技术使人们可以更精细地调节基因表达水平, 并可同时改变细胞内多个基因的转录水平, 是代谢工程研究新的有力工具。

关键词: 定向进化, 启动子工程, 全局转录机制, 代谢工程

Directed evolution of promoter and cellular transcription machinery and its application in microbial metabolic engineering— a review

Xinqing Zhao, Rujiao Jiang, and Fengwu Bai

Department of Bioscience and Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

Abstract: Directed evolution, which is also called molecular evolution, or artificial evolution, combines random mutagenesis and directed selection. In previous studies, it has been extensively applied for the improvement of enzyme catalytic properties and stability, as well as the expanding of substrate specificity. In recent years, directed evolution was also employed in metabolic engineering of promoters for improving their strength and function, and the engineering of global transcription machinery. These techniques contribute to breeding more tolerant strains against environmental stress, as well as strains with improved fermentation efficiency. In this article, we reviewed the applications of directed evolution in the metabolic engineering of promoters and global transcription machinery. These techniques enabled fine-tuning of gene expression and simultaneous alternation of multiple gene transcription inside the cells, and thus are powerful new tools for metabolic engineering.

Keywords: directed evolution, promoter engineering, global transcriptional machinery, metabolic engineering

Received: March 24, 2009; **Accepted:** May 22, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30500011).

Corresponding author: Xinqing Zhao. Tel: +86-411-84707617; E-mail: xqzhao@dlut.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 30500011)资助。

利用易错 PCR (Error prone PCR) 或 DNA 改组 (DNA shuffling) 对酶分子编码基因进行定向进化, 通过对基因进行随机突变(或基因重组)和定向选择, 可获得催化效率提高的酶蛋白, 并改善酶的一系列性质, 如稳定性^[1-2]、底物特异性^[3]等, 是蛋白质工程的重要工具。近年来, 定向进化技术也成功应用于非催化蛋白编码基因, 如 DNA 结合蛋白以及基因启动子区的遗传工程改造, 并在酵母菌、乳杆菌等微生物的代谢工程改造中得到成功应用。以下综述了近年来定向进化技术对启动子活性和调节特性的改造, 以及对细胞全局转录机制的代谢工程改造。

1 启动子的定向进化

传统代谢工程操作经常利用强启动子过量表达关键酶的基因以过量生产某种代谢产物, 但基因的过量表达可引起细胞内部的过量负担, 造成细胞内整体代谢辅酶的不平衡或细胞生长底物的缺乏。对某一基因的敲除可能影响其他代谢途径的辅酶或者前体物供应。越来越多的研究也表明, 某些基因适度表达而不是过量表达能取得更好的效果, 如木酮糖激酶基因过量表达后抑制酵母在木糖培养基中的生长, 只有木酮糖激酶活性适中的时候, 酵母在木糖中的生长和乙醇发酵才达到最佳状态^[4]。这就要求在代谢工程操作中对基因表达进行精细的调控。利用诱导型启动子可以实现对基因不同表达强度的控制, 但是诱导剂通常比较昂贵, 而且对细胞具有一定的毒性。对强启动子的分子进化可以得到不同活性范围的启动子, 实现基因的精细调控。

早期利用启动子的-10 和-35 间隔区的合成启动子文库, 获得了启动子活性至少变化 400 倍的不同启动子突变体^[5]。Alper 等^[6]通过易错 PCR, 获得了噬菌体 PL- λ 启动子活性变化范围较大的突变启动子文库, 利用绿色荧光蛋白(GFP)荧光的监测可知启动子的活性在 196 倍的范围内变化, 而 *gfp* 基因的转录分析证明突变启动子导致的转录水平可在 325 倍的范围内变化, 证明了通过随机突变可以获得启动子活性差别较大的突变体, 达到对基因进行精细调节的目的。最新一项研究证明, 对巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)强启动子 P_{AOX1} 的转录因子结合序

列(Transcription factor binding sites, *TFBSs*)进行删除或倍增的突变操作后, *AOX1* 启动子的活性可在 6% 至 160% 之间变化, 证明了突变可使启动子活性在广泛范围得到改变^[7]。

早期的报道证明 *GPD1* 基因的过量表达提高了酵母菌甘油的产率, 但是细胞生长受到了抑制^[8]。Nevoigt 等^[9]报道了利用 *TEF1* 启动子的突变体文库对酵母菌 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因进行精细调控的结果, 证明中等启动子活性可在不影响生长的前提下实现甘油的最大产率。在另一项研究中, 将 *dxs* 基因置于不同活性的启动子下研究大肠杆菌番茄红素的生产, 发现中等强度表达的基因产生的番茄红素最多^[6], 有力证明了适量的启动子活性对代谢调控的重要性。

在代谢途径中限速步骤往往是由多个基因控制的, 因此成功的代谢工程操作需要对多个基因的表达进行平衡操作才能实现目的。2007 年提出的多基因启动子改组 (Multiple gene-promoter shuffling, MGPS) 方法^[10], 首先选择代谢途径关键基因, 以及限速步骤基因自身的启动子, 并将不同活性的启动子与关键酶基因进行多个组合, 构建表达载体转化酵母, 进而筛选性状改善的转化子。利用木糖代谢和糖酵解途径的 3 个关键酶基因(*PYK1*、*TKL1*、*TAL1*) 和强启动子(*HXK2* 启动子)、弱启动子(*PYK1* 启动子) 2 种启动子, 共 8 个基因-启动子组合, 构建表达载体, 结果筛选到了乙醇产量提高 8 倍、发酵速率提高 2 倍的转化子, 明显改善了酵母菌基因工程菌发酵木糖生产乙醇的效率。在 MGPS 中利用的是野生型的启动子, 没有对启动子进行突变, 但可以预见, 结合启动子的定向进化, 启动子改组将可能实现对基因表达的更优化调控。

除了启动子的强度可以进行定向进化, 启动子的调节功能也能通过人工进化得到改变。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 *DAN1* 启动子对溶氧敏感, 在厌氧条件下活性很强, 而在有氧条件下没有活性。由于这个启动子需要绝对厌氧条件下才能诱导, 因此操作条件比较苛刻。Nevoigt 等^[11]利用带有黄色荧光蛋白的报告载体对通过易错 PCR 得到的启动子突变体文库进行检测, 获得了在微氧条件下也能够

诱导表达的启动子突变体,其启动子活性在微氧条件下是野生型启动子的 1.8~2.9 倍。这使得突变启动子可以在停止供氧的条件下方便地得到诱导,再次证明了启动子的定向进化在调节基因表达中的作用。

2 基因转录机制的定向进化

调节启动子的活性和调节功能是调节基因转录机制的重要手段,但其调控只限制在个别基因。而微生物的某些性状是由多基因控制的,对单独控制几个基因的表达难以达到理想的效果。通过对调节基因转录的调节蛋白的重组和突变,可实现对多基因性状的调控。

2.1 锌指蛋白的锌指结构基元改组与基因调控

锌指结构是锌指蛋白中高度特异的 DNA 结合域,锌指蛋白含有锌指结构和激活或抑制功能区,细胞内多种调节蛋白里都有 1 个或者多个锌指结构,每个锌指能识别 3 个碱基的 DNA 序列,称为锌指结构基元^[12]。Park 等^[13]对多个锌指结构基元进行了改组,构建了人工的锌指基元文库,并转化酵母,获得了对热处理、渗透胁迫和抗真菌药物咪康唑(Ketoconazole)抗性提高的酵母突变体。由于抗性通常是受多基因控制的,证明了转录因子的定向进化可同时改变细胞内多个基因的表达水平。将来自酵母的锌指蛋白文库亚克隆到大肠杆菌表达载体上转化大肠杆菌,筛选到了耐温性大大提高的突变体^[14],证明了人工锌指蛋白组合文库在原核生物中的应用。此外,人工锌指基元结合转录激活或者抑制功能区的人工转录因子文库也成功应用于提高酿酒酵母和动物细胞(HEK 293 细胞系)生产重组蛋白的效率^[15]。

2.2 细胞全局转录因子定向进化

细胞全局转录机制工程(Global transcription machinery engineering, gTME)通过对转录复合体成分,尤其是负责 DNA 序列识别从而决定 RNA 聚合酶结合偏好性的转录因子进行定向进化,从而对细胞整体的转录进行大规模的重组。Alper 等^[16]利用易错 PCR 对大肠杆菌(*Escherichia coli*)编码 σ 70 的 *ropD* 基因构建随机突变文库,并连接到低拷贝载体转化含有野生型 *ropD* 基因的大肠杆菌 DH5 α ,获得的乙醇耐受突变株在 50 g/L 乙醇条件下倍增时间为

3.5 h,而前人所得到的乙醇耐性最好的 *E. coli* 菌株在同等条件下倍增时间为 4~6 h^[17]。转录水平分析显示在无乙醇条件下,与对照组相比突变株中 72 个基因的转录水平发生变化。在 20 g/L 乙醇条件下培养突变株的 354 个基因转录水平有变化,这些基因大都与逆境胁迫响应有关,其中也包括乙醇胁迫。对酿酒酵母转录复合体 TFIID 的 TATA 结合蛋白(SPT15)和 TATA 结合蛋白辅助因子(TAF25)编码基因分别进行随机突变,先后在 5%乙醇、100 g/L 葡萄糖和 6%乙醇、120 g/L 葡萄糖的背景下筛选突变株,分离到性状最好的突变株 *spt15-300*,在 6%乙醇的培养条件下其生长速率能达到对照组的 13 倍^[18]。对植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)的 σ 因子进行随机突变得到突变文库,并转化植物乳杆菌,利用乳酸耐受实验筛选得到的最佳突变株 S6,生长速率约为野生型的 3.5 倍,低 pH 受实验筛选得到的最佳突变株 H13 生长速率比野生型高 25%。该突变株在无机酸和乳酸环境下的生长速率均快于野生型植物乳杆菌,乳酸产量也更大^[19]。

与基因组改组方法^[20-21]相比,细胞全局转录工程不需要原生质体制备和融合的步骤,操作方法更加简便,而且着眼于调控细胞整体基因转录的目标,定向性更强。对所得到的性能提高的突变体进行深入分子机制分析,可提供关键的目标以便进行下一步的定向代谢工程改造。例如,对乳杆菌的 σ 因子的 gTME 操作发现, σ 因子的 1 个氨基酸位点突变(Q345K)就可明显提高菌株对乳酸的耐性和在高浓度乳酸中的生长速率,以及提高对高浓度盐的耐性^[19]。而对酿酒酵母的转录起始复合体成分编码基因 *SPT15* 的研究表明,3 个氨基酸残基的突变(F177S、Y195H、K218R)可能导致 SPT15 与 SPT3 蛋白的结合发生变化,从而改变了细胞内几百个基因的转录^[18]。未来的研究可利用这些结果实现对微生物的定向突变,加快菌种选育的进程。本课题组对酿酒酵母的 *SPT3* 基因进行 gTME 操作,也筛选到了乙醇耐性提高的突变体,目前正在分析突变株耐性提高的分子机制。可以预见,gTME 在多种工业微生物的育种中将得到更广泛的应用。

3 结论和展望

利用定向进化技术对启动子进行随机突变和定向筛选、实现对基因转录水平的精细调节, 可实现对代谢网络的适度调控, 使细胞代谢网络实现平衡进化。通过细胞整体转录机制的定向进化选择代谢网络优化的个体, 可获得细胞内多个基因转录同时得到改变的个体。这些研究极大扩展了定向进化技术在生物技术领域的应用, 使工业微生物菌种改造从经典的物理或化学随机突变向对特定启动子的定向进化和细胞整体代谢网络的操纵转变, 快速高效地提高菌种的胁迫耐受性和生产性能。

在启动子的工程操作和细胞全局转录工程操作中, 研究者均使用了易错 PCR, 比较在经典随机突变中使用的亚硝基胍, 通过易错 PCR 得到的乳杆菌 σ 因子突变体文库, 其性状的多样性远远大于 40%~50% 致死率时亚硝基胍的突变效果^[19]。这解释了细胞全局转录工程在对多基因性状的代谢工程操作中的有效性。启动子的工程操作和细胞全局转录工程操作研究表明, 细胞代谢网络具有很大的弹性, 可通过多种手段对代谢通量进行优化, 从而获得性能优良的工业微生物菌种。目前对启动子和细胞转录机制的代谢工程操作还需要筛选大量的突变体, 而对性能提高的突变体进行代谢通量分析和转录组学分析, 利用获得的信息进一步对菌种进行定向代谢工程改造, 将使人们更快速改造细胞的代谢和生理功能, 所积累的对细胞代谢调控的认识, 也将应用于系统生物学和合成生物学的研究^[22-23], 使人们能更有效地控制和设计细胞工厂, 获得优良的微生物生产菌种。

REFERENCES

- [1] Eijsink VG, Gaseidnes S, Borchert TV, *et al.* Directed evolution of enzyme stability. *Biomol Eng*, 2005, **22**: 21–30.
- [2] Arnold FH, Wintrode PL, Miyazaki K, *et al.* How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends Biochem Sci*, 2001, **26**(2): 100–106.
- [3] Turner NJ. Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends Biotechnol*, 2003, **21**(11): 474–478.
- [4] Jin YS, Ni H, Laplaza JM, *et al.* Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xylulokinase activity. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(1): 495–503.
- [5] Jensen PR, Hammer K. The sequence of spacers between the consensus sequences modulates the strength of prokaryotic promoters. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**(1): 82–87.
- [6] Alper H, Fischer C, Nevoigt E, *et al.* Tuning genetic control through promoter engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(36): 12678–12683.
- [7] Hartner FS, Ruth C, Langenegger D, *et al.* Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**(12): e76.
- [8] Sumio M, Roustan JL, Remize F, *et al.* Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for *GPD1* encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast*, 1997, **13**(9): 783–793.
- [9] Nevoigt E, Kohnke J, Fischer CR, *et al.* Engineering of promoter replacement cassettes for fine-tuning of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(8): 5266–5273.
- [10] Lu C, Jeffries T. Shuffling of promoters for multiple genes to optimize xylose fermentation in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(19): 6072–6077.
- [11] Nevoigt E, Fischer C, Mucha O, *et al.* Engineering promoter regulation. *Biotechnol Bioeng*, 2007, **96**(3): 550–558.
- [12] Brown RS. Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. *Curr Opin Struct Biol*, 2005, **15**(1): 94–98.
- [13] Park KS, Lee DK, Lee H, *et al.* Phenotypic alteration of eukaryotic cells using randomized libraries of artificial transcription factors. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(10): 1208–1214.
- [14] Park KS, Jang YS, Lee H, *et al.* Phenotypic alteration and target gene identification using combinatorial libraries of zinc finger proteins in prokaryotic cells. *J Bacteriol*, 2005, **187**(15): 5496–5499.
- [15] Park KS, Seol W, Yang HY, *et al.* Identification and use of zinc finger transcription factors that increase production of recombinant proteins in yeast and mammalian cells. *Biotechnol Prog*, 2005, **21**(3): 664–670.
- [16] Alper H, Stephanopoulos G. Global transcription machinery engineering: a new approach for improving cellular phenotype. *Metab Eng*, 2007, **9**(3): 258–267.
- [17] Yomano LP, York SW, Ingram LO. Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *E. coli* KO11 for fuel ethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1998, **20**(2): 132–138.
- [18] Alper H, Moxley J, Nevoigt E, *et al.* Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science*, 2006, **314**(5805): 1565–1568.
- [19] Marcuschamer KD, Stephanopoulos G. Assessing the potential of mutational strategies to elicit new phenotypes in industrial strains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(7): 2319–2324.
- [20] Zhang YX, Perry K, Vinci VA, *et al.* Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature*, 2002, **415**: 644–646.
- [21] Patnaik R, Louie S, Gavrilovic V, *et al.* Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**(7): 707–712.
- [22] Lee SY, Lee DY, Kim TY. Systems biotechnology for strain improvement. *Trends Biotechnol*, 2005, **23**(7): 349–358.
- [23] Drubin DA, Way JC, Silver PA. Designing biological systems. *Genes Dev*, 2007, **21**(3): 242–254.