

# 利用合成调控 RNA 技术提高大肠杆菌异源合成红霉素前体 6-脱氧红霉内酯 B 产量

宋书杰<sup>1,2\*</sup>, 熊智强<sup>1\*</sup>, 王勇<sup>1</sup>

1 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所 合成生物学重点实验室, 上海 200032

2 上海海洋大学 食品学院海洋药物教研室, 上海 200306

宋书杰, 熊智强, 王勇. 利用合成调控 RNA 技术提高大肠杆菌异源合成红霉素前体 6-脱氧红霉内酯 B 产量. 生物工程学报, 2015, 31(7): 1039–1049.

Song SJ, Xiong ZQ, Wang Y. Enhancing erythromycin precursor 6-dEB production by using synthetic small regulatory RNAs in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2015, 31(7): 1039–1049.

**摘要:** 红霉素为代表的聚酮类化合物已经成功的在大肠杆菌中实现了异源合成, 但其产量仍然较低 (仅 ~10 mg/L)。本研究基于大肠杆菌全基因组代谢模型 iAF1260, 利用通量平衡分析预测了红霉素母核 6-脱氧红霉内酯 (6-Deoxyerythronolide B, 6-dEB) 生物合成的关键靶点, 通过合成调控 RNA 技术 (Synthetic small regulatory RNAs, sRNAs) 对预测的靶点进行验证。结果表明, 以弱化 *lscC* (编码 LsrABC 转运蛋白) 和 *ackA* (编码乙酸激酶蛋白) 为代表的靶点改造可以显著提高 6-dEB 异源合成, 提高幅度可达 48.7%。通过弱化靶点的组合, 进一步改善了 6-dEB 的异源合成, 产量最终可达 22.8 mg/L, 比出发菌株产量提高 59.9%。本研究发现和确认了 6 个有效的调控靶点, 最终成功地改善了 6-dEB 在大肠杆菌中的异源合成。研究表明, 通量分布比较分析结合 sRNAs 技术是一种有效的方法提高 6-dEB 异源合成, 也为改善其他代谢产物的异源合成提供了可供借鉴的研究思路。

**关键词:** 大肠杆菌, 6-脱氧红霉内酯, 异源合成, 全基因组代谢模型, sRNA 技术

**Received:** December 15, 2014; **Accepted:** January 30, 2015

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA02A701), National Basic Research and Development Program of China (973 Program) (No. 2012CB721104), National Natural Science Foundation of China (No. 31170101).

**Corresponding author:** Yong Wang. Tel/Fax: +86-21-54924295; E-mail: yongwang@sibs.ac.cn

\*These authors contributed equally to this study.

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2012AA02A701), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2012CB721104), 国家自然科学基金 (No. 31170101) 资助。

# Enhancing erythromycin precursor 6-dEB production by using synthetic small regulatory RNAs in *Escherichia coli*

Shujie Song<sup>1,2\*</sup>, Zhiqiang Xiong<sup>1\*</sup>, and Yong Wang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Synthetic Biology, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Science, Chinese Academy of Science, Shanghai 200032, China

<sup>2</sup> Marine Medicine Laboratory, College of Food Science & technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 200306, China

**Abstract:** Although heterologous biosynthesis of polyketide erythromycin has been successfully achieved in *Escherichia coli*, the titer remains at a very low level (~10 mg/L). In this study, based on genome-scale metabolic model of *E. coli*, *in silico* method flux distribution comparison analysis was used to discover novel potential targets for heterologous 6-dEB biosynthesis. Synthetic small regulatory RNAs (sRNAs) was used to experimentally test 12 down-regulated targets. The results showed that repression of each of these target genes e.g. *lsrC* and *ackA* led to significantly improve heterologous 6-dEB biosynthesis. Using co-repression of *lsrC* and *ackA*, 6-dEB titer was improved by 59.9% in shake-flask with a maximum yield of 22.8 mg/L. This study indicates that combined flux distribution comparison analysis and synthetic small regulatory RNAs is an effective strategy to improve 6-dEB production in *E. coli*.

**Keywords:** *Escherichia coli*, 6-deoxyerythronolide B, heterologous biosynthesis, genome-scale metabolic model, synthetic small regulatory RNAs

红霉素是目前聚酮类化合物生物合成研究最为清楚的模式化合物，其生物合成途径的建立和机制的解析，为异源生物合成获得红霉素或其衍生物奠定了基础。在过去的十年中，大肠杆菌以其良好的异源基因表达特性和遗传特性，越来越成为聚酮异源合成的主流通用宿主之一。通过合成生物学的设计，目前已经解决了 ACP 修饰、前体供应、红霉内酯环的后修饰等关键问题<sup>[1-2]</sup>，实现了在大肠杆菌中的异源合成。其高效合成体系的设计，也做了诸多的尝试：如为了提高质粒稳定性，2003 年 Murli 等<sup>[3]</sup>用 *pccB* 和 *pccA* 基因整合到 *Escherichia coli* 编码甲基丙二酰辅酶 A 脱羧酶 *ygfG* 位点，同时用 RSF1010 的复制起始位点替换 pET28a 来源于 pBR322 的起始位点，将 pBP144 改造为 pKOS207-129，获得工程菌株 K207-3/pKOS207-129/pBP130 在摇瓶中

可以获得 22.5 mg/L 的 6-dEB。Lau 等<sup>[4]</sup>利用该菌株，在 5 L 生物反应器中，以分批补料的方法进行高密度培养，得到了 1.1 g/L 的 6-dEB，这是到目前为止，6-dEB 异源生物合成的最高纪录。为了提高宿主本身的稳定性，Wang 等<sup>[5]</sup>将红霉素聚酮合酶基因 *eryAI*、*eryAII* 和 *eryAIII* 通过染色体重组 Red/ET 方法整合入大肠杆菌染色体上，获得了染色体修饰的稳定菌株，与多个质粒共表达相比，该菌株可稳定的合成红霉素中间体 6-dEB。Wang 等<sup>[6]</sup>在早期的研究中发现，在红霉糖多胞菌中过量表达 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因对红霉素的生物合成有促进作用。通过在大肠杆菌中过量表达该基因，将大肠杆菌中 6-dEB 的产量提高了一倍<sup>[7]</sup>。此外，通过前体代谢工程手段，对大肠杆菌异源合成聚酮类化合物做了一系列的定向合成尝试<sup>[8]</sup>。

尽管以红霉素为代表的聚酮异源生物合成获得了巨大的进展,但是仍然存在着诸多问题。比如,目前无抗菌活性的红霉素中间体 6-dEB 在高密度培养大肠杆菌中的效价约为 1.1 g/L,而红霉素的活性产物红霉素 A 或红霉素 C 在大肠杆菌中的效价却低于 1 mg/L。尽管有着发酵周期、遗传操作等诸多优势,这一水平与红霉素的原产株红霉糖多孢菌相比,仍然有较大的差距(工业规模中,红霉糖多孢菌产红霉素 A 效价可达 5–10 g/L)。本课题组通过基于全局代谢网络模型的 *in silico* 模拟计算发现<sup>[9]</sup>,在目前以大肠杆菌为宿主的红霉素异源合成中,即使给予充足的丙酸前体,其中仅有约 5%–10% 的前体直接参与了聚酮的合成,而其他的前体即使供应充足,也并不参与聚酮的生物合成。计算还发现,目前大肠杆菌合成聚酮化合物的实际产量仅到了理论产量的 1/10 左右。这说明复杂天然产物在底盘细胞中的异源合成仍有巨大的提升空间,绝不仅仅是引入新的合成途径这样简单。我们需要对这一复杂代谢网络的本质和作用规律有更深层次的认识,以此指导设计更高效的异源合成系统。

近年来,基因组尺度代谢模型(Genome-scale metabolic model, GSMM)的提出<sup>[10]</sup>使菌种改造研究提升到系统的高度。随着组学数据的日益丰富和完善,大肠杆菌、酿酒酵母等多个物种的全基因组代谢网络模型得以重建。结合经典的代谢网络通量分析方法(如代谢通量分析(Metabolic flux analysis, MFA)<sup>[11–12]</sup>、通量平衡分析(Flux balance analysis, FBA)、最小代谢调整分析(Minimization of metabolic adjustment, MOMA)<sup>[13]</sup>等),人们可对宿主细胞

的代谢表型进行模拟和预测,从而发现一些可能影响目标化合物产量的关键节点;通过对这些节点实施改造可改变细胞代谢流的分布状况,使得更多的碳架底物通向目标产物的合成,从而改善目标产物的产量。在前期研究中,我们针对红霉素合成关键中间体 6dEB 异源合成产率低的问题(这也是目前异源合成普遍存在的问题),分析了其在不同异源宿主中的最大理论产率、影响理论产率的关键因素以及为提高产率而可能需要改造的潜在基因位点。

本研究中,我们基于 Fiest 等<sup>[14]</sup>构建的 *E. coli* 基因组尺度代谢模型 iAF1260,利用 *in silico* 分析挖掘出了若干需要弱化的关键靶点基因。采用 sRNA (Synthetic small regulatory RNAs) 技术,对拟下调的关键靶点进行了实验验证(即在翻译水平上通过 sRNA 干扰调控靶点基因的表达<sup>[15]</sup>,利用 sRNA 与靶基因的 mRNA 结合,从而阻遏靶基因的 mRNA 与核糖体的结合,继而抑制靶基因的蛋白表达),并取得了良好的结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒及相关试剂

菌株 *E. coli* DH10B 作为克隆宿主,菌株 *E. coli* WG (pZG07/pZG08) 为聚酮类化合物红霉素母核 6-dEB 的生产菌(表 1)。分子克隆相关的酶、DNA 片段与质粒抽提纯化试剂盒分别由 NEB 公司、TaKaRa 公司及 Axygen 公司提供。培养基、抗生素及其他相关试剂购自 Oxiod、国药集团与上海生工生物工程技术有限公司。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

表 1 本研究所用到的菌种和质粒

Table 1 Plasmids and strains utilized in this study

Strain and plasmid	Relevant characteristics	Source
WG	F-ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3) DprpRBCDHT7prom-sfp, T7prom-prpE	Stored in our lab
DH10B	F-endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ (ara, leu)7697 mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), λ-	Invitrogen
BL21 (DE3)	F-ompT gal dcm lon hsdSB (rB- mB-) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Invitrogen
pZG07	pET21c derived, T7prom-DEBS2-ribosome binding site-DEBS3-T7term, ampicillin	Stored in our lab
pZG08	pET28a derived, T7prom- <i>pccB-rbs-accA1</i> -T7prom-DEBS1-T7term, kanamycin	Stored in our lab
pJF650	pACYCDuent-1 derived, whose T7 promoter site was replaced with <i>deo</i> -sRNA sequences in-frame, chloramphenicol	This study
pSJ02	pJF650 derived, carrying Pr Promoter- <i>tdcD</i> binding site- <i>micC</i> -Pr terminator, chloramphenicol	This study
pSJ07	pJF650 derived, carrying Pr Promoter- <i>pflD</i> binding site- <i>micC</i> -Pr terminator, chloramphenicol	This study
pSJ08	pJF650 derived, carrying Pr Promoter- <i>paaF</i> binding site- <i>micC</i> -Pr terminator, chloramphenicol	This study
pSJ09	pJF650 derived, carrying Pr Promoter- <i>fadJ</i> binding site- <i>micC</i> -Pr terminator, chloramphenicol	This study
pSJ10	pJF650 derived, carrying Pr Promoter- <i>fadB</i> binding site- <i>micC</i> -Pr terminator, chloramphenicol	This study
pSJ11	pJF650 derived, carrying Pr Promoter- <i>ackA</i> binding site- <i>micC</i> -Pr terminator, chloramphenicol	This study
pSJ10	pJF650 derived, carrying Pr Promoter- <i>pta</i> binding site- <i>micC</i> -Pr terminator, chloramphenicol	This study
pSJ13	pJF650 derived, carrying Pr Promoter- <i>leuD</i> binding site- <i>micC</i> -Pr terminator, chloramphenicol	This study
pSJ14	pJF650 derived, carrying Pr Promoter- <i>leuC</i> binding site- <i>micC</i> -Pr terminator, chloramphenicol	This study
pSJ20	pJF651 derived, carrying Pr Promoter- <i>ptsH</i> binding site- <i>micC</i> -Pr terminator, chloramphenicol	This study
pSJ21	pJF652 derived, carrying Pr Promoter- <i>ptsI</i> binding site- <i>micC</i> -Pr terminator, chloramphenicol	This study
pSJ53	pJF653 derived, carrying Pr Promoter- <i>IsrC</i> binding site- <i>micC</i> -Pr terminator, chloramphenicol	This study

## 1.2 sRNAs 质粒构建

本研究采用 sRNAs 调控大肠杆菌染色体基因。质粒构建方法如下<sup>[16]</sup>: 弱化靶点 *deoB* (编码磷酸戊糖变位酶)的 sRNAs 基因序列片段 *deoB*-sRNA (表 2) (包括 Pr 启动子、*deoB* 靶基因结合位点和 TE 终止子, 并在两端分别引入 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切位点), 由上海捷瑞生物工程有限公司直接化学合成。通过引物 pACYC-F 和 pACYC-R, 以 pACYCDunet-1 为模板, 克隆得到只含氯霉素抗性和 p15A 复制子的载体片

段, 回收后采用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切; 同时采用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切上述化学合成的 *deoB*-sRNA 序列片段。清洁回收双酶切后的载体片段和 *deoB*-sRNA 片段通过 T4DNA 连接酶连接, 得到模板质粒 pJF650。

以出发质粒 pJF650 为模板, 采用 25 μL 的 PCR 体系: 2×GC 缓冲液 I 12.5 μL, 上下游引物各 0.25 μL, dNTPs 2.5 μL, 模板质粒 0.25 μL, LA *Taq* 酶 0.25 μL, ddH<sub>2</sub>O 将反应体系补足至 25 μL; 利用表 2 中的引物, 通过定点突变 PCR

扩增直接获得能够弱化大肠杆菌中不同靶点基因表达的 sRNAs 质粒。以构建弱化 *tdcD* 靶基因的 sRNA 质粒为例,采用表 2 中的 *tdcD*-sRNA-F 和 *tdcD*-sRNA-R 引物及上述 PCR 条件,以模板

质粒 pJF650 为模板,通过定点突变 PCR 直接将 pJF650 质粒骨架 *deoB* 靶基因结合位点突变成 *tdcD* 靶基因结合位点,得到能够弱化 *tdcD* 基因的质粒 pSJ02。

表 2 本研究所用到的引物

Table 2 Primers involved in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>tdcD</i> -sRNA-F	CAAAACAACCGGAAATTCATTCATTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCC
<i>tdcD</i> -sRNA-R	ATGAATGAATTTCCGGTGTTTTGGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTA
<i>pflD</i> -sRNA-F	GAGGCGAGAGATACGATTCGTCATTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCC
<i>pflD</i> -sRNA-R	ATGACGAATCGTATCTCTCGCCTCGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTA
<i>paaF</i> -sRNA-F	ACGGCTGACGATCAGTTTCGCTCATTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCC
<i>paaF</i> -sRNA-R	ATGAGCGAACTGATCGTCAGCCGTGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTA
<i>fadJ</i> -sRNA-F	GGTAAACGCTGATGTCATTTCCATTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCC
<i>fadJ</i> -sRNA-R	ATGGAAATGACATCAGCGTTTACCAGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTA
<i>fadB</i> -sRNA-F	CAGGGTGTGCGCTTTGTAAAGCATTCTGTTGGGCCATTGCATTGCC
<i>fadB</i> -sRNA-R	ATGCTTTACAAAGGCGACACCCTGGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTA
<i>ackA</i> -sRNA-F	AACCAGTACTAACTTACTCGACATTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCC
<i>ackA</i> -sRNA-R	ATGTCGAGTAAGTTAGTACTGGTTGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTA
<i>pta</i> -sRNA-F	GATCAGCATAATAATACGGGACACTTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCC
<i>pta</i> -sRNA-R	GTGTCCCGTATTATTATGCTGATCGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTA
<i>leuD</i> -sRNA-F	GTGTTTGATAAATTTCTCTGCCATTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCC
<i>leuD</i> -sRNA-R	ATGGCAGAGAAATTTATCAAACACGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTA
<i>leuC</i> -sRNA-F	TTTTTCGTATAACGTCTTAGCCATTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCC
<i>leuC</i> -sRNA-R	ATGGCTAAGACGTTATACGAAAAAGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTA
<i>ptsH</i> -sRNA-F	AATGGTAACTTCTTGCTGGAACATTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCC
<i>ptsH</i> -sRNA-R	ATGTTCCAGCAAGAAGTTACCATTGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTA
<i>ptsI</i> -sRNA-F	GGATGCTAAAATGCCTGAAATCATTCTGTTGGGCCATTGCATTGCC
<i>ptsI</i> -sRNA-R	ATGATTCAGGCATTTTAGCATCCGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTA
<i>lsrC</i> -sRNA-F	GTTGTTCTGAATAAACTTCAGCATTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCC
<i>lsrC</i> -sRNA-R	ATGCTGAAGTTTATTCAGAACAACGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTA
pACYC-F	CCCAAGCTTCTGAAACCTCAGGCATTTGA
pACYC-R	CGGGATCCGCGCAACGCAATTAATGTAA
<i>deoB</i> -sRNA	CATATGGGATCCTAACACCGTGCCTGTTGACTATTTACCTCTGGCGGTGATAATGGTTGCCACCA TAATAAATGCACGTTTCATTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCCACTGATTTCCAACATATAAAAA GACAAGCCCGAACAGTCGTCGGGCTTTTTTCTCGAGCTCGAGCCAGGCATCAAATAAAACGA AAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCTTTTCGTTTATCTGTTTTTGTTCGGTGAACGCTCTCTACTAG AGTCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCTTTCTGCGTTTATAACTAGTAGATCTAAGCTT

### 1.3 *In silico* 模型的构建与靶点预测

通量分布比较分析典 (Flux distribution comparison analysis, FDCA) 是建立在通量平衡分析 (FBA) 基础上的一种代谢通量分析方法, 即是从代谢反应的通量变化出发, 上溯到相应的基因, 是一种自下而上 (Bottom-up) 的算法。本研究采用大肠杆菌基因组尺度代谢模型 iAF1260 为计算模型, 分别以生物量和最佳红霉素母核 6-dEB 合成速率为目标, 进行通量比较分析, 计算相应的代谢通量分布, 找出差异显著的节点 (反应), 这些节点将成为影响红霉素母核 6-dEB 合成的潜在改造靶点。

### 1.4 菌株的培养与发酵

#### 1.4.1 菌株的培养

将 sRNAs 质粒 (以 pACYCDuet-1 作为对照) 转化到 6-dEB 产生菌 *E. coli* WG (pZG07/pZG08) 中, 挑取单菌落到含有氨苄青霉素 100  $\mu\text{g/L}$ 、卡那霉素 50  $\mu\text{g/L}$  和氯霉素 34  $\mu\text{g/L}$  抗性的 LB 培养基 (NaCl 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 甘油 15 g/L) 中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 过夜培养, 作为种子液备用。

#### 1.4.2 菌株的发酵

发酵采用摇瓶培养: 在 100 mL 三角摇瓶中加入 10 mL 发酵培养基<sup>[17]</sup> (NaCl 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 甘油 15 g/L, 100 mmol/L HEPES, pH 7.6, 含有氨苄青霉素 100  $\mu\text{g/L}$ , 卡那霉素 50  $\mu\text{g/L}$ , 氯霉素 34  $\mu\text{g/L}$ , 诱导剂异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 24  $\mu\text{g/mL}$ , 前体丙酸钠 20  $\mu\text{mmol/L}$ )。将 1% 的种子液接种于发酵培养基中, 置于 22  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 的摇床上发酵 5 d, 每个样品 3 次平行。

### 1.5 分析检测

菌体的生长状况使用比浊法测定, 即用

UV2000 紫外分光光度计在波长  $\lambda=600$  nm 时测定菌液的吸光值  $A$  ( $OD_{600}$ )。

发酵产物 6-dEB 利用 HPLC-ELSD 进行分析检测<sup>[18]</sup>, 测定条件如下: 色谱柱为 TSK-100V (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$ 50 mm), 流速 1 mL/min, 流动相为乙腈和水, 采用 50%乙腈等度洗脱。ELSD 检测器条件: 漂移管温度 50  $^{\circ}\text{C}$ , 气体流速 1.6 L/min, 增益值 8。

## 2 结果与分析

### 2.1 *In silico* 预测关键基因靶点

FDCA 方法是本课题组开发的基于全基因组代谢模型新算法, 依据本研究中 FDCA 方法描述, 我们首先设定最大生物量和最大红霉素母核 6-dEB 生物合成速率 (预期菌株) 作为两个独立的目标, 进行通量平衡分析, 再对两个设定目标的基因尺度通量分布进行比较, 挖掘出大量潜在的代谢靶点 (反应)<sup>[9]</sup>。基于 6-dEB 合成途径的前体供应代谢网络, 筛选出 12 个潜在需要弱化的基因靶点进行实验验证 (表 3)。

### 2.2 sRNAs 技术弱化预测靶点

sRNAs 技术<sup>[16]</sup>是一种新的细菌基因调控方法, 主要在翻译水平上利用 sRNA 干扰可以有效地弱化靶点基因的表达。本研究预测靶点的弱化学验证是利用 sRNAs 技术来实施, 由图 1A 可知, 与对照空质粒 pACYCDuet-1 相比, 单独弱化 12 个靶点基因对细胞生长都有轻微的促进作用; 例如弱化 *lsrC* 基因的菌株  $OD_{600}$  达到 18 (对照菌  $OD_{600}$  为 15)。总体而言, 弱化筛选的靶点对菌株生长没有显著影响。

单独弱化 12 个靶点基因对宿主主导源合成 6-dEB 的影响却有明显差异 (图 1B 和 1C)。实验表明, 弱化 *lsrC*、*ptsH*、*ptsI*、*fadB*、*ackA* 和

表 3 拟弱化的基因位点

Table 3 The potential down-regulated sites

Gene ID	Genes	Reaction (enzyme)
b3846	<i>fadB</i>	Fatty acid oxidation complex
b1514	<i>lsrC</i>	Autoinducer-2 ABC transporter
b2415	<i>ptsH</i>	The phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system HPr
b2416	<i>ptsI</i>	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase PtsI
b2296	<i>ackA</i>	Acetatekinase
b2297	<i>pta</i>	Phosphateacetyltransferase/phosphatepropionyltransferase
b0071	<i>leuD</i>	Isopropylmalateisomerase LeuD
b0072	<i>leuC</i>	Isopropylmalateisomerase LeuC
b2341	<i>fadJ</i>	FadJ component of anaerobic fatty acid oxidation complex
b3115	<i>tdcD</i>	Propionatekinase
b1393	<i>paaF</i>	Predicted 2,3-dehydroadipyl-CoA hydratase
b3951	<i>pflD</i>	Formate acetyltransferase 2

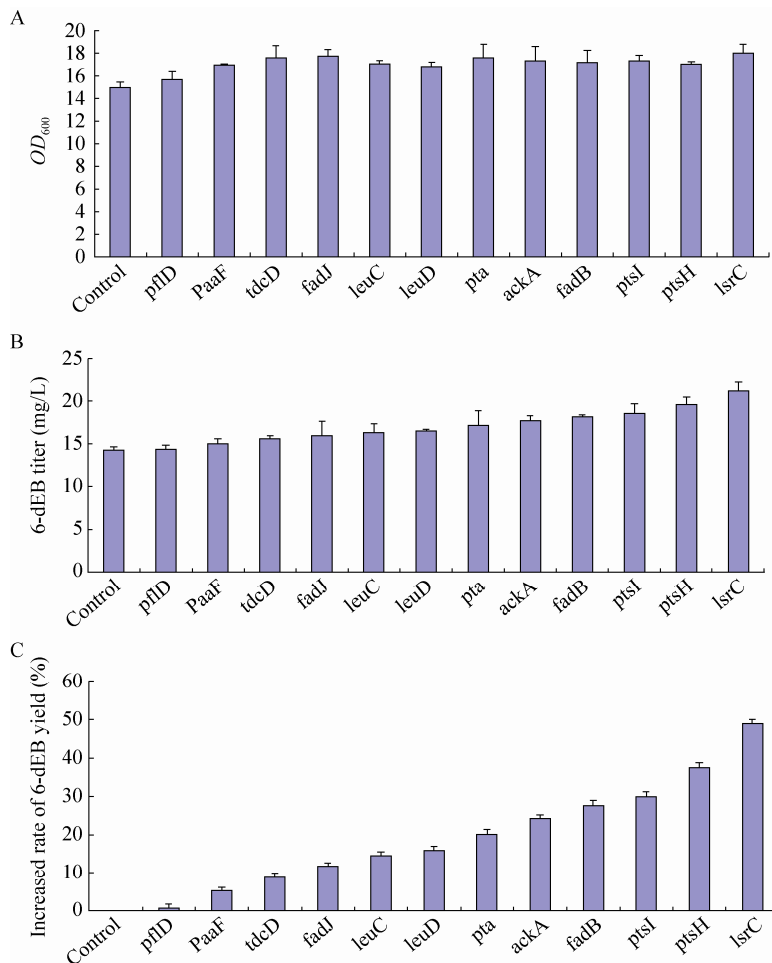
图 1 sRNAs 弱化调控对 *E. coli* 合成 6-dEB 的影响

Fig. 1 Influence of heterologous 6-dEB production in *E. coli* by using sRNAs. (A) Cell growth. (B) 6dEB titer. (C) The increased rate of 6dEB yield.

*pta* 基因后宿主菌的 6-dEB 产量分别为 21.3、19.6、18.6、18.2、17.8 和 17.2 mg/L, 而对照菌仅为 14.3 mg/L。6-dEB 产量提高率分别为 49%、37%、30%、28%、24%和 20%。弱化 *leuD*、*leuC* 和 *fadJ* 基因位点, 6-dEB 产量分别为 16.6、16.4 和 16.0 mg/L, 产量提高为 10%–20%。而弱化 *pfID*、*paaF* 和 *tdcD* 产量提高率小于 10%。因此, 大部分弱化靶点能够提高 6-dEB 异源合成。由于弱化单个基因位点有效, 我们推测组合弱化或同时弱化多个基因位点可能进一步提高 6-dEB 异源合成。

### 2.3 组合弱化调控基因位点

为了验证组合弱化调控能够进一步提高

6-dEB 异源合成, 我们对 *lsrC* 与 *fadB*、*ackA*、*pta*、*ptsH*、*ptsI* 进行了组合弱化实验。由图 2 可知, 同时弱化 *lsrC+ackA*、*lsrC+fadB*、*lsrC+ptsI* 双基因位点, 6-dEB 产量达到 22.8、21.49 和 21.47 mg/L, 其产量提高率为 59.9%、50.4%和 50.2%; 而弱化 *lsrC+ptsH* 和 *lsrC+pta* 组合, 6-dEB 产量为 14.08 和 20.98 mg/L, 提高率为 46.7%和 1.3%。从比产率考察, 弱化双基因位点对比产率提高率都在 20%以上, 其中最高组合为 *lsrC+ptsI*, 比产率提高率为 54%。与单独弱化 *lsrC* 基因位点产量相比, 组合弱化 *lsrC+ackA*、*lsrC+fadB* 和 *lsrC+ptsI* 能够进一步提高生产菌的 6-dEB 异源合成能力。

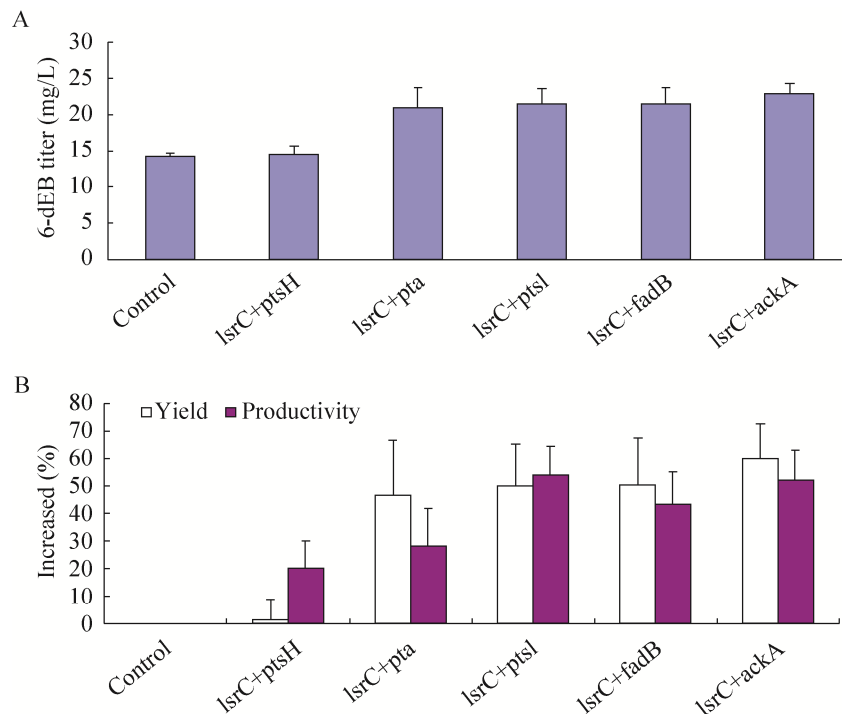


图 2 组合弱化对异源合成 6-dEB 的影响

Fig. 2 Effect of co-repression of the target genes on 6dEB production. (A) 6dEB titer. (B) The increased rate of 6dEB yield and productivity.



### 3 讨论

大肠杆菌是目前生产红霉素等聚酮类化合物最具潜力的底盘细胞<sup>[9]</sup>, 相关的研究也取得了一系列进展<sup>[2,5,7-8,17-22]</sup>。但仅依靠单一靶点基因的改造或传统的途径工程改造等方法很难获得更高效的红霉素生产菌。随着全基因尺度的代谢模型的发展, 基于大肠杆菌全基因尺度调控来改善红霉素异源合成成为可能。*E. coli*基因组尺度代谢模型<sup>[14]</sup>和不同算法<sup>[23-24]</sup>为挖掘更多的靶点以改善目标产物合成提供了更多的机会。FDCA方法是基于FBA基础上而发展成的通量比较分析方法<sup>[9]</sup>。本课题组<sup>[25]</sup>曾利用FDCA方法对大肠杆菌异源合成萜类化合物前体供应进行计算分析和实验验证, 得到51个关键基因位点, 改造后的菌株成功地使萜类化合物在大肠杆菌中的产量提高174%。其中约20%的靶点是首次发现的新靶点。本研究基于*E. coli*基因组尺度代谢模型iAF1260进行FDCA分析, 成功地预测出提高6-dEB异源合成的靶点基因。证明了这一方法在预测新靶点方面的可靠性和可行性。

本研究通过sRNAs技术弱化改造宿主的染色体基因, 成功改善了6-dEB的合成。研究结果表明, 弱化一些靶点可显著提高宿主合成6-dEB的能力。其中*lsrC* (编码LsrABC转运蛋白)、*ptsH* (编码磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统HPr蛋白) 和*ptsI* (编码磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统PTSI蛋白) 是*E. coli*中重要的转运蛋白组分<sup>[26]</sup>; 而靶点*fadB*、*ackA*和*pta*分别编码脂肪酸氧化反应复合体的 $\alpha$ -单元、乙酸激酶和磷酸转乙酰酶。由于这些靶点并不处于6-dEB合成通路之中, 其功能似与异源6dEB合成并无直接关联, 这些靶点的弱化可能间接影响了6dEB合成

相关的前体物质或辅因子供给, 其提高6dEB合成的机理有待进一步研究。

sRNAs技术是最近发展的一种细菌基因弱化方法<sup>[16]</sup>, 在翻译水平上利用sRNAs与靶基因的mRNA结合, 阻遏靶基因的mRNA与核糖体的结合, 最终抑制靶基因的蛋白表达。相比基因敲除方法, 它可以更加简单地对基因组中各基因进行调控, 也可以快速地、较高通量地同时对多个基因靶点进行弱化, 这也是这一方法的优越性所在。与*in silico*的模型预测相结合, 这一方法展示出巨大的优越性。Lee课题组<sup>[15-16]</sup>通过设计构建表达sRNAs质粒, 将sRNA技术应用到酪氨酸和尸胺cadaverine生产中, 高通量筛选出有效改造靶点, 使酪氨酸产量达到2 g/L以上, cadaverine生产菌产量提高了55%。因此, 采用sRNAs技术可以有效的对调控靶点进行表达弱化。随着更多的细菌调控RNA发现和功能解析, 相信sRNAs技术在细菌代谢工程和合成生物学上必将有着广泛的应用。

综上所述, 本研究基于*in silico*的方法预测新靶点基因, 利用sRNAs技术最终发现和确认了6个有效的调控靶点, 成功改善了6-dEB在大肠杆菌中的异源合成。这一策略和方法的成功, 也为进一步改善其他代谢产物的异源合成提供了研究思路。

### REFERENCES

- [1] Pfeifer BA, Admiraal SJ, Gramajo H, et al. Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*. *Science*, 2001, 291(5509): 1790-1792.
- [2] Zhang H, Wang Y, Wu J, et al. Complete biosynthesis of erythromycin A and designed analogs using *E. coli* as a heterologous host. *Chem*

- Biol, 2010, 17(11): 1232–1240.
- [3] Murli S, Kennedy J, Dayem LC, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improved 6-deoxyerythronolide B production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003, 30(8): 500–509.
- [4] Lau J, Tran C, Licari P, et al. Development of a high cell-density fed-batch bioprocess for the heterologous production of 6-deoxyerythronolide B in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2004, 110(1): 95–103.
- [5] Wang Y, Pfeifer BA. 6-Deoxyerythronolide B production through chromosomal localization of the deoxyerythronolide B synthase genes in *E. coli*. *Metab Eng*, 2008, 10(1): 33–38.
- [6] Wang Y, Wang Y, Chu J, et al. Improved production of erythromycin A by expression of a heterologous gene encoding S-adenosylmethionine synthetase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75(4): 837–842.
- [7] Wang Y, Boghigian BA, Pfeifer BA. Improving heterologous polyketide production in *Escherichia coli* by overexpression of an S-adenosylmethionine synthetase gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77(2): 367–373.
- [8] Zhang H, Wang Y, Boghigian B, et al. Probing the heterologous metabolism supporting 6-deoxyerythronolide B biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microb Biotechnol*, 2009, 2(3): 390–394.
- [9] Meng H, Lu Z, Wang Y, et al. *In silico* improvement of heterologous biosynthesis of erythromycin precursor 6-deoxyerythronolide B in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2011, 16(3): 445–456.
- [10] Edwards JS, Palsson BO. The *Escherichia coli* MG1655 *in silico* metabolic genotype: its definition, characteristics, and capabilities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(10): 5528–5533.
- [11] Varmar A, Palsson BO. Metabolic capabilities of *Escherichia coli*: I. synthesis of biosynthetic precursors and cofactors. *J Theor Biol*, 1993, 165(4): 477–502.
- [12] Varmar A, Palsson BO. Metabolic capabilities of *Escherichia coli*: 2. optimal-growth patterns. *J Theor Biol*, 1993, 165(4): 503–522.
- [13] Segre D, Vitkup D, Church GM. Analysis of optimality in natural and perturbed metabolic networks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(23): 15112–15117.
- [14] Feist AM, Henry CS, Reed JL, et al. A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Mol Syst Biol*, 2007, 3(1): 121.
- [15] Na D, Yoo SM, Chung H, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(2): 170–174.
- [16] Yoo SM, Na D, Lee SY. Design and use of synthetic regulatory small RNAs to control gene expression in *Escherichia coli*. *Nat Protoc*, 2013, 8(9): 1694–1707.
- [17] Pfeifer B, Hu Z, Licari P, et al. Process and metabolic strategies for improved production of *Escherichia coli* derived 6-deoxyerythronolide B. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(7): 3287–3292.
- [18] Pistorino M, Pfeifer BA. Efficient experimental design and micro-scale medium enhancement of 6-deoxyerythronolide B production through *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 2009, 25(5): 1364–1371.
- [19] Dayem LC, Carney JR, Santi DV, et al. Metab Eng of a methylmalonyl-CoA Mutase-Epimerase pathway for complex polyketide biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 2002, 41(16): 5193–5201.
- [20] Zhang H, Boghigian BA, Pfeifer BA. Investigating the role of native propionyl-CoA and methylmalonyl-CoA metabolism on heterologous polyketide production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105(3): 567–573.
- [21] Wang JF, Xiong ZQ, Li SY, et al. Enhancing

- isoprenoid production through systematically assembling and modulating efflux pumps in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(18): 8057–8067.
- [22] Wang Y, Pfeifer BA. 6-Deoxyerythronolide B production through chromosomal localization of the deoxyerythronolide B synthase genes in *E. coli*. *Metab Eng*, 2008, 10(1): 33–38.
- [23] Lper H, Jin YS, Moxley J, et al. Identifying gene targets for the Metab Eng of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2005, 7(3): 155–164.
- [24] Xu P, Ranganathan S, Fowler ZL, et al. Genome-scale metabolic network modeling results in minimal interventions that cooperatively force carbon flux towards malonyl-CoA. *Metab Eng*, 2011, 13(5): 578–587.
- [25] Wang JF, Meng HL, Xiong ZQ, et al. Identification of novel knockout and up-regulated targets for improving isoprenoid production in *E. coli*. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(5): 1021–1027.
- [26] Bologna FP, Bermudez VA, Saavedra DD, et al. Characterization of *Escherichia coli* EutD: a phosphotransacetylase of the ethanolamine operon. *J Microbiol*, 2010, 48(5): 629–636.

(本文责编 陈宏宇)



### 本刊副主编李寅研究员课题组在大肠杆菌中实现碳浓缩固碳

将 CO<sub>2</sub> 转化为燃料或化学品，是实现 CO<sub>2</sub> 的资源化利用、缓解资源能源短缺和温室效应的一种途径。经遗传改造的蓝细菌或者藻类等光合自养微生物，可以将 CO<sub>2</sub> 转化为包括乙醇、丁醇、丙酮、异丁醛、乳酸等在内的数十种化学品，但由于自养生物生长速度慢，将 CO<sub>2</sub> 通过生物方法转化为这些化学品的效率还比较低。

异养生物可以通过磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶等自有途径固定 CO<sub>2</sub>，但目前尚不清楚光合生物的固碳途径是否能在异养生物中发挥作用，效率如何。如果能够在异养生物醇解途径的基础上引入额外的固碳途径并发挥功能，则有可能为目标代谢产物的生产，提供额外的碳架来源。

从这一假设出发，研究人员在大肠杆菌中导入了卡尔文循环中的磷酸核酮糖激酶和核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶，发现可以在大肠杆菌的中央代谢中固定额外的 CO<sub>2</sub>。采用基于 <sup>13</sup>C 的定量分析发现，CO<sub>2</sub> 的供给是大肠杆菌异养固碳的限速步骤。进一步引入蓝细菌特有的碳浓缩机制，大肠杆菌中央代谢的固碳速率可以达到 22.5 mg CO<sub>2</sub> g DCW<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>，与 14 种蓝细菌和藻类的固碳速率 (3.5–23.7 mg CO<sub>2</sub> g DCW<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) 相当，实现了蓝细菌固碳和碳浓缩机制在异养生物中的重编程，为进一步提高异养生物固碳效率奠定了基础。

这些结果已于 2015 年 6 月 18 日在 *Biotechnology for Biofuels* 在线发表，李寅课题组的博士生巩伏雨为该文章的第一作者。蔡真副研究员和李寅研究员为该文的共同通讯作者。该研究得到了国家科技部“973 计划”和国家自然科学基金的资助。

文章链接 <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/8/1/86>

(摘编自：中国科学院微生物研究所网站)