

A decorative graphic consisting of several overlapping, horizontal brushstrokes in a vibrant green color, creating a textured, painterly effect. The strokes are layered, with some appearing more prominent than others, and they have a slightly irregular, hand-painted quality.

2019

读书报告

汇报人：牛铭铭

2019.08.04



Metabolic Engineering
Volume 49, September 2018, Pages 143-152



IF=8.33

Boosting heterologous protein production yield by adjusting global nitrogen and carbon metabolic regulatory networks in *Bacillus subtilis*

Haojie Cao, Julio Villatoro-Hernandez, Ruud Detert Oude Weme, Erike Frenzel, Oscar P. Kuipers  

 Show more

<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.08.001>

[Get rights and content](#)

通过调节枯草芽孢杆菌中全局性的氮和碳代谢调节网络来提高异源蛋白质产量



CONTENTS

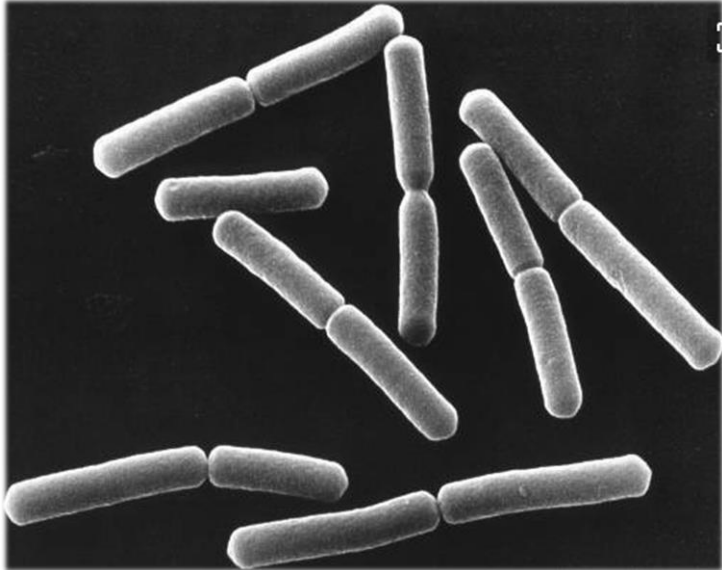
- 1** Introduction
- 2** Methods and Material
- 3** Results and Discussion
- 4** Conclusion



Introduction

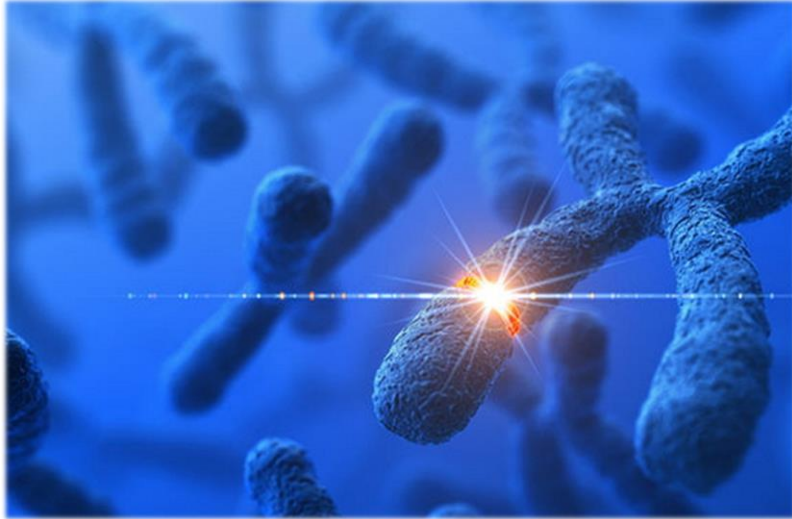
1 Introduction

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*



枯草芽孢杆菌是一种充分表征的微生物细胞工厂，广泛用于生产商业和医疗应用的各种蛋白质。(Song *et al.*, 2015; van Dijk and Hecker, 2013; Westers *et al.*, 2004; Zweers *et al.*, 2008)

1 Introduction



目前已经采用了许多工程和生物技术方法来提高工程菌株的产量，例如通过利用修饰的启动子和RBS，密码子优化，途径重新路由或基因破坏(Chen *et al.*, 2015, Kang *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2017)。



Introduction

在自然界中，健康细胞中各种资源的细胞内分布已经在很长一段时间内通过自然进化而“优化” (Wu *et al.*, 2016)。

将异源蛋白质的过表达途径引入工程化生物体需要大部分宿主细胞的资源，包括ATP，碳水化合物和氨基酸。这种强加的代谢紊乱被定义为“代谢负担”或“代谢负荷”(Zou *et al.*, 2017)。



Introduction

细胞维持的基本要求¹在工程微生物中变得不平衡和²不足 (Pitera *et al.*, 2007)。

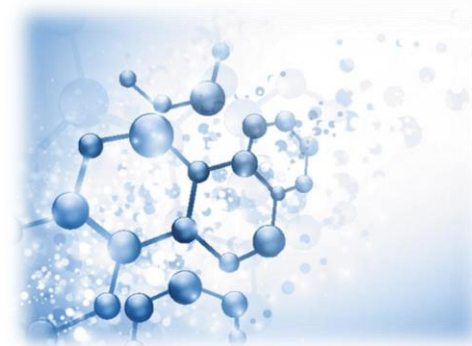
表达的目的产物的生物合成产率将保持在相对较低的水平(Colletti *et al.*, 2011, Glick, 1995), 或在次优生长条件下甚至突然落入'悬崖'下的'死亡谷' (最低生产水平) (Wu *et al.*, 2016)。

1 Introduction

提出观点：

通过增强所需营养素的摄取和平衡异源和天然代谢通量需求来减少微生物宿主中的代谢负担的策略，这可能有利于大量目的产物的稳健生产

。





Introduction

全局性转录调控因子 CodY

CodY是革兰氏阳性菌中的全局性转录调控因子，可以调节稳定期早期基因和芽胞形成相关基因，同时可以调控碳氮代谢途径中关键基因的表达。

在细胞内高水平的GTP和支链氨基酸（BCAAs;异亮氨酸，缬氨酸和亮氨酸）存在的情况下，全局性转录调节因子CodY抑制或不太频繁地诱导靶基因在指数后期或早期稳定期的转录。

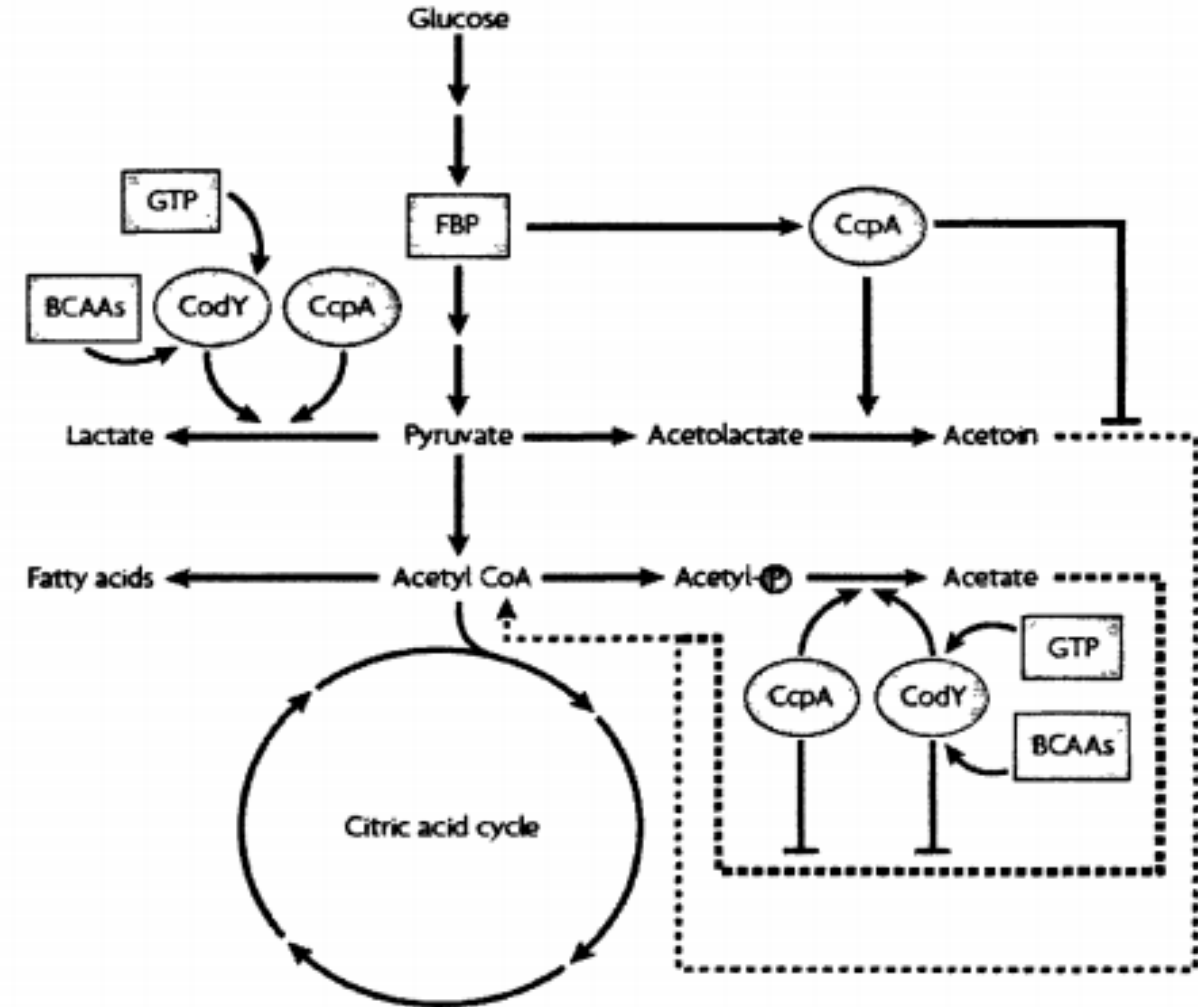


Introduction

分解代谢物控制蛋白 (CcpA)

CcpA(catabolite control protein A)是一种具有多效性功能的调控蛋白。在革兰氏阳性菌中，CcpA不仅参与碳分解代谢物阻遏(carbon catabolite repression,CCR)效应，还参与生物被膜形成和毒力基因表达等多种生理过程。

1 Introduction



CodY和CcpA都表现为基因表达的阻遏物或激活物。这两种全球调节蛋白及其配体FBP, GTP和BCAAs共同控制大调节子的交叉点平衡可用营养源的使用, 系统地协调细胞内碳和氮通量, 并通过刺激特定的分解代谢过程促进细胞稳态。

图1-5 调控因子对TCA循环的调控模型(Abraham, 2007)



Introduction

全局转录调控工程(gTME)

——a New Powerful Tool for Metabolic and Cell Engineering

该方法试图通过工程化特别选择的全局调节因子直接操作细胞的转录组来引发新的表型，允许同时以最高水平调节多基因表达，同样对原核和真核细胞的表型改善具有深远意义 (Alper and Stephanopoulos, 2007) 。



Methods and Material

2

菌株的构建

JV156 (168_β-gal)

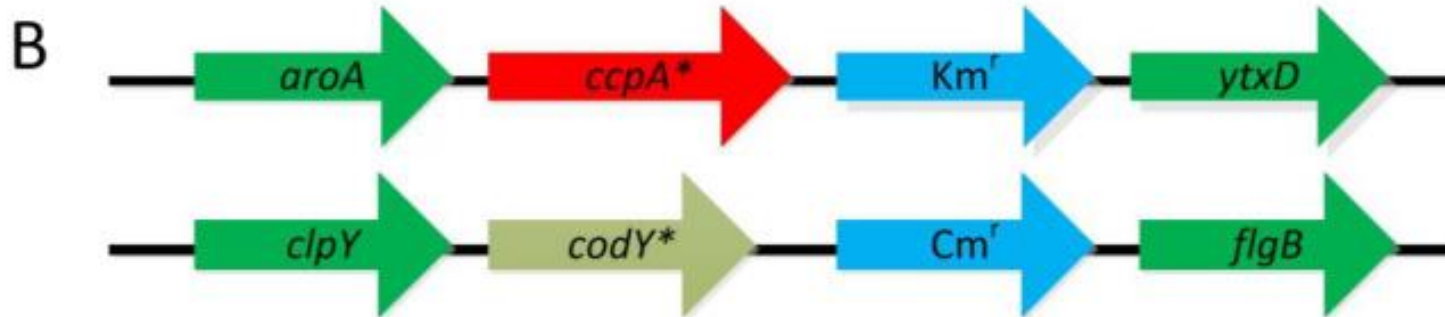
为了创建可调的过表达系统，将含有β-半乳糖苷酶编码基因 (*lacZ*) 的表达组件引入 IPTG 诱导系统 (Claessen 等, 2008)。通过双同源重组将该构建体整合到 *mdr* 基因座中，从而确保在枯草芽孢杆菌 168 的染色体中仅存在一个编码酶的 DNA 拷贝。



2

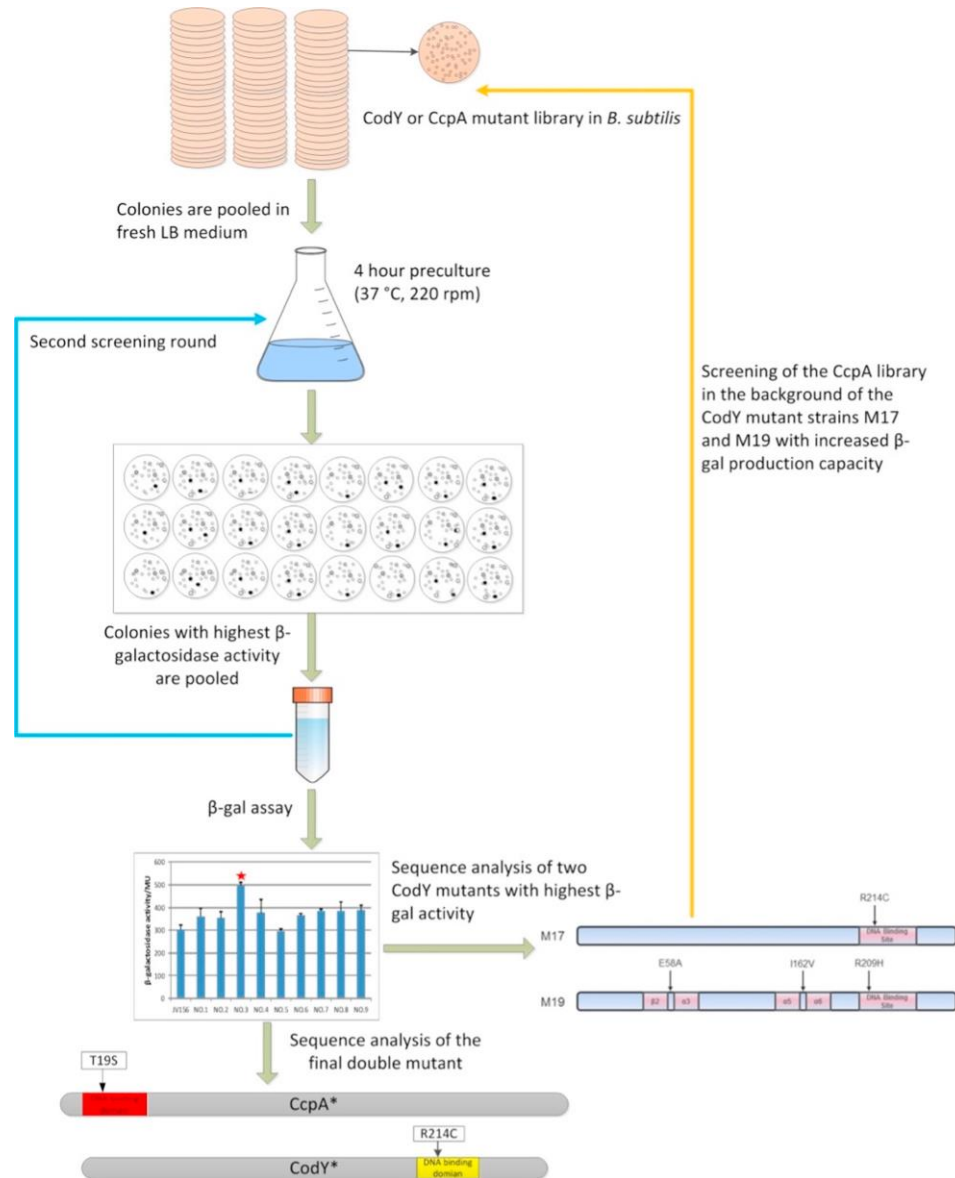
codY和ccpA的突变体文库的构建

随机诱变 → 克隆到pJV54 → 转化E.coli → 提取质粒 →
转化B. subtilis → 双同源重组 → B. subtilis中的codY*、
ccpA* 文库



2

具有增加 β -半乳糖苷酶生产能力的枯草芽孢杆菌CodY和CcpA突变体的蓝白斑筛选

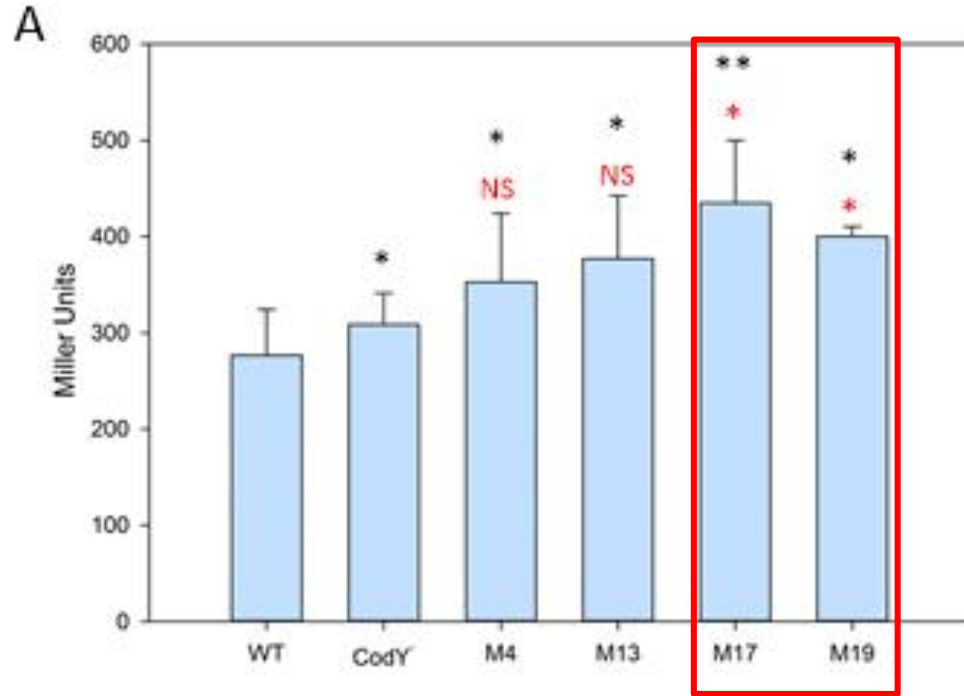




Results and Discussion

3

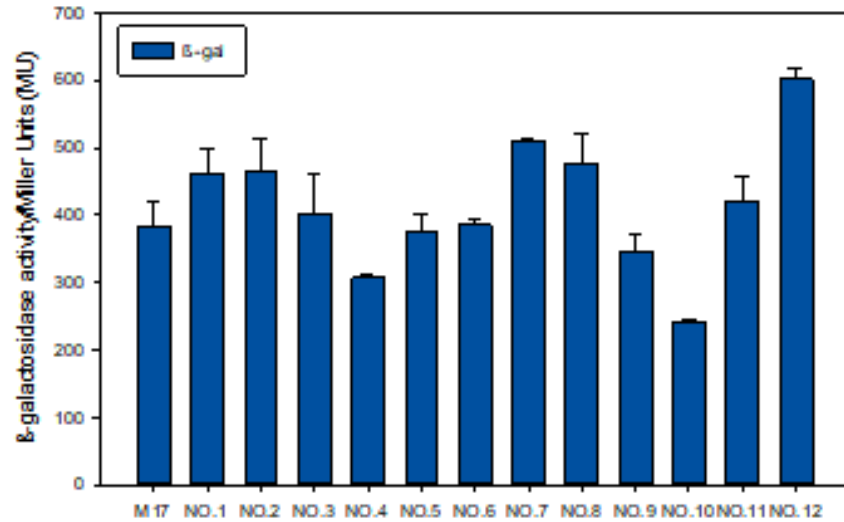
CodY和CcpA的gTME文库允许选择具有增加的 β -半乳糖苷酶产生能力的枯草芽孢杆菌突变体



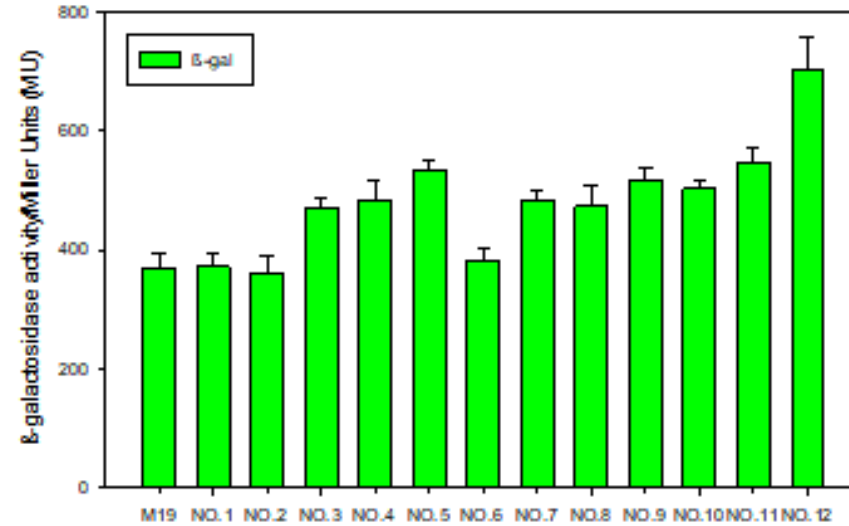
与酶促蛋白生产能力筛选相结合的gTME方法可成功应用于枯草芽孢杆菌并且CodY的DNA结合结构域内的特定突变导致异源蛋白 β -半乳糖苷酶的产物产量显著增加。

3

M17和M19突变体中碳代谢网络的重新编排



Seq012	55	A->T	T19S	ACC->TCC	19
Seq012	297	T->C	S99S	TCT->TCC	99
Seq012	673	G->A	D225N	GAT->AAT	225
Seq012	850	G->A	V284I	GTT->ATT	284
Seq012	854	G->A	R285H	CGT->CAT	285

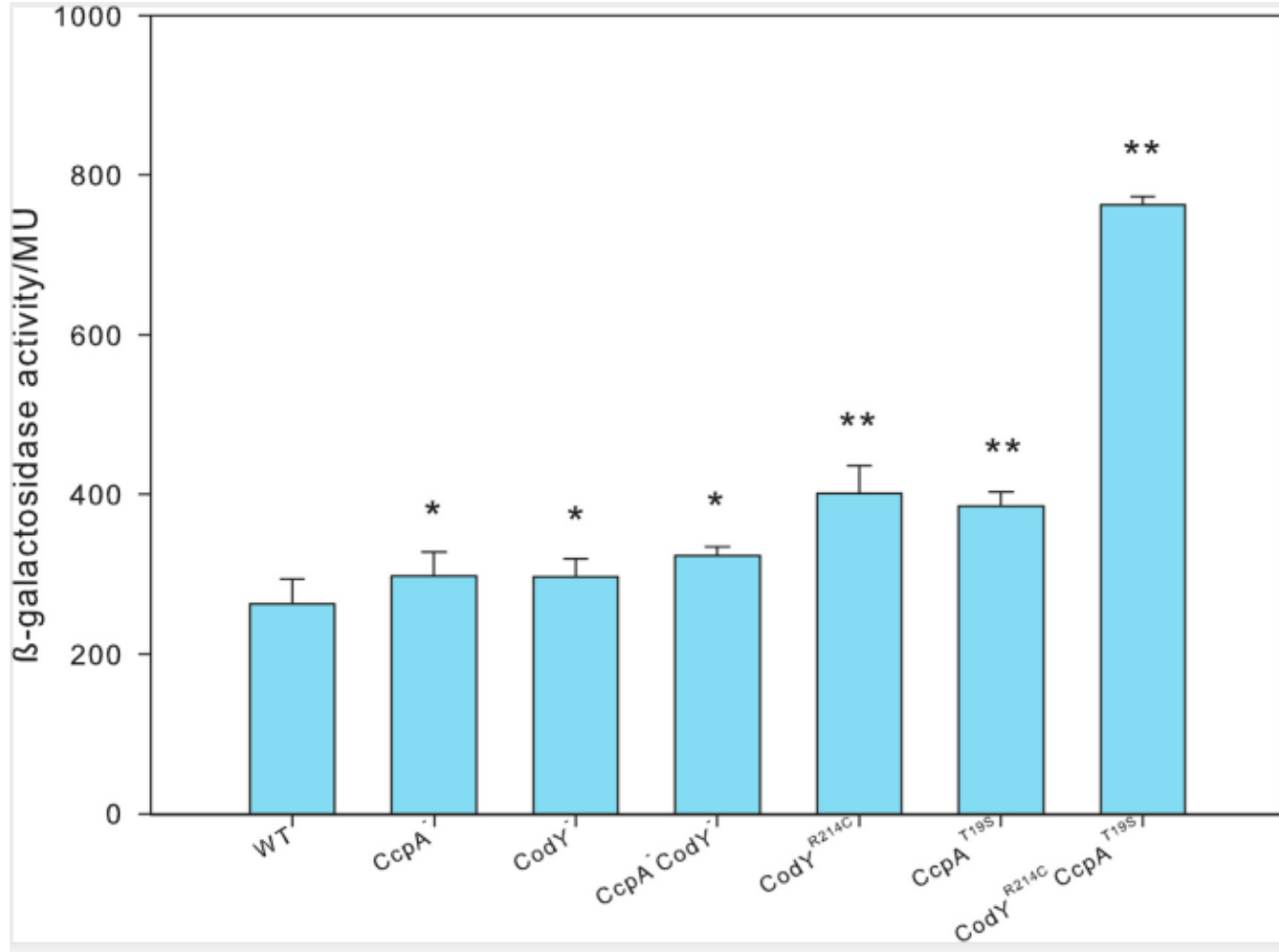


Seq012	56	C->G	T19S	ACC->AGC	19
Seq012	152	C->A	A51E	GCG->GAG	51
Seq012	915	G->A	L305L	CTG->CTA	305
Seq012	967	C->T	P323S	CCG->TCG	323

来自两个不同文库的两个表现最佳的表型在CcpA的DNA结合HTH基序中显示相同的氨基酸交换T19S。

3

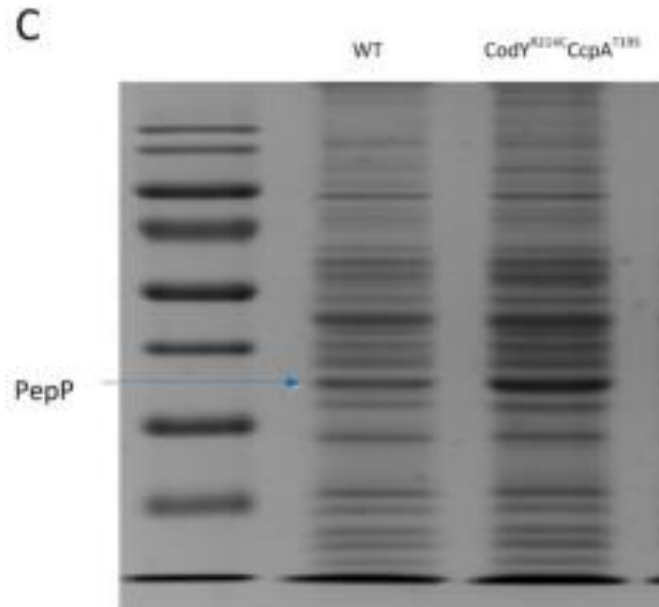
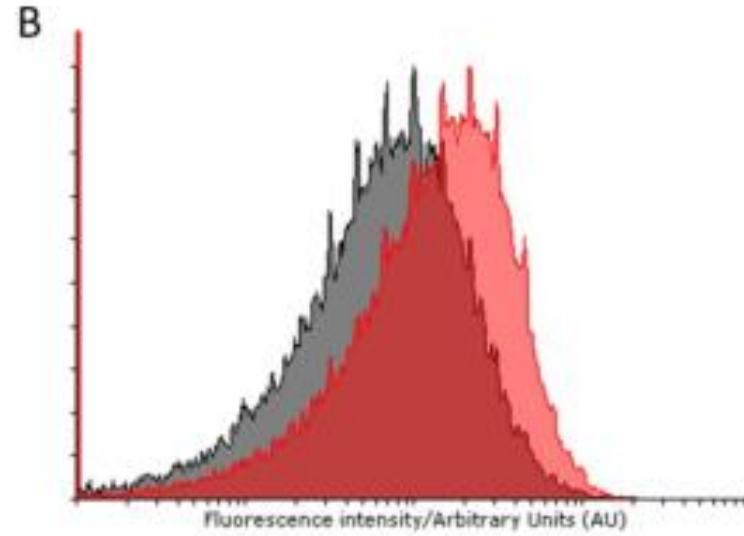
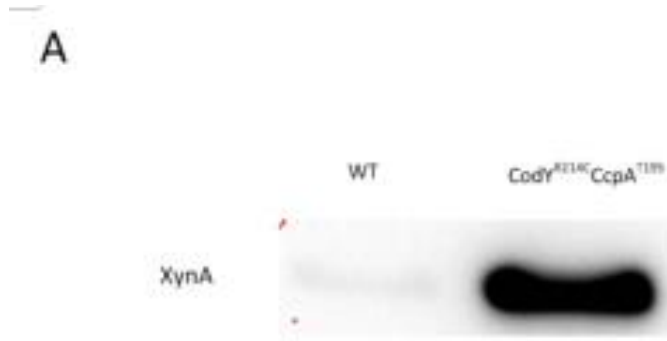
CcpA的定点诱变



与亲本WT对照菌株168_β-gal相比，所有转录因子突变体均显示出显著增加的β-gal活性。

3

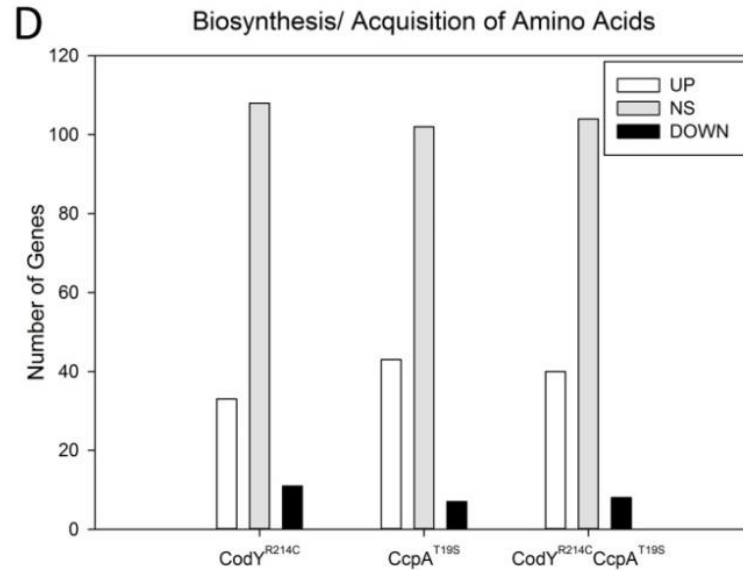
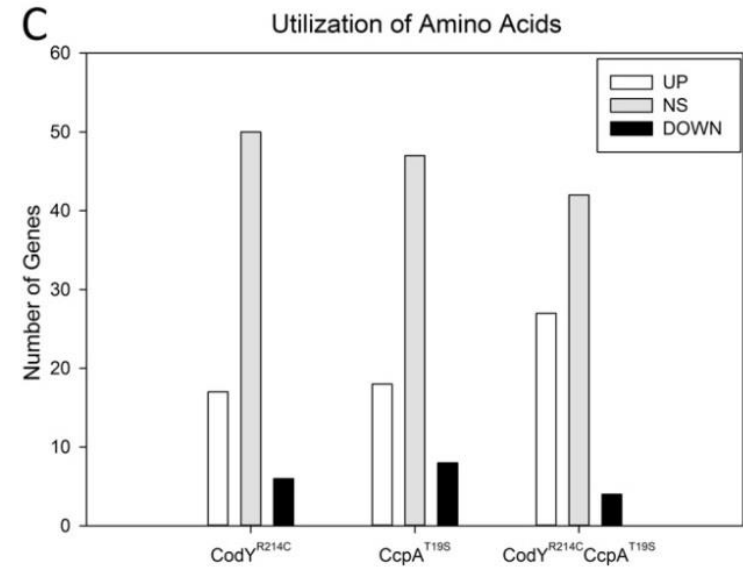
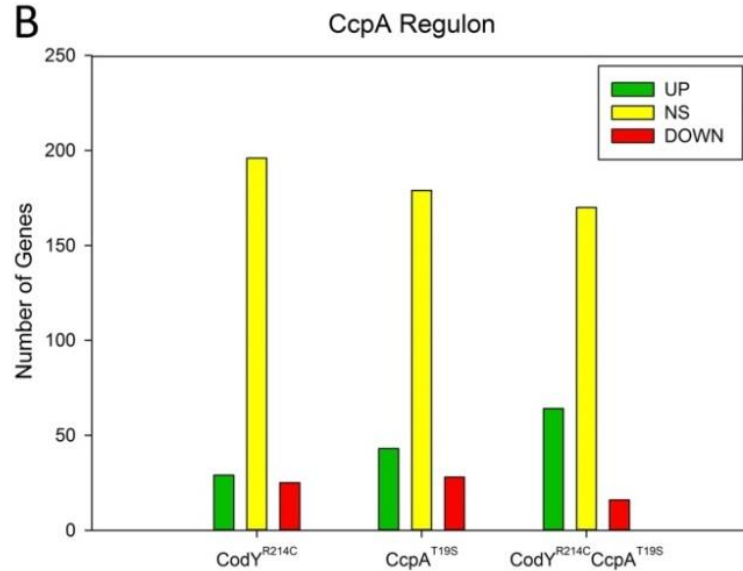
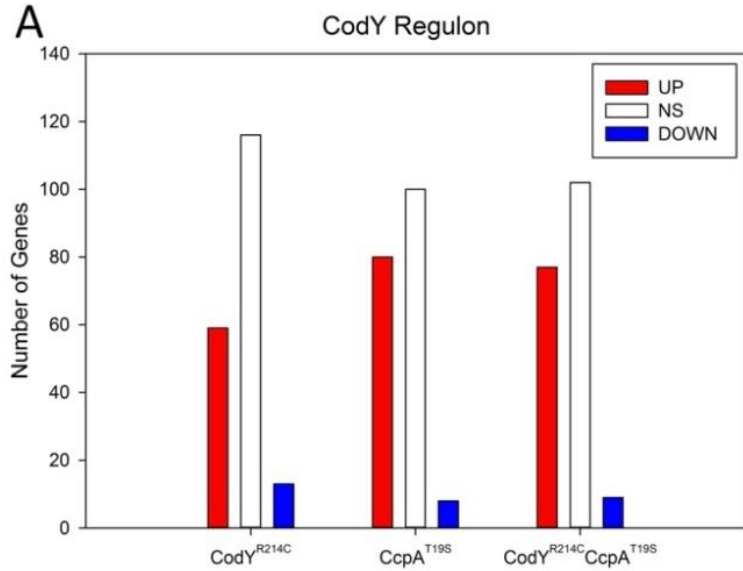
在其它细菌产生酶的验证



这表明，在转基因细胞工厂中，各种蛋白质的生产力都得到了提高。

3

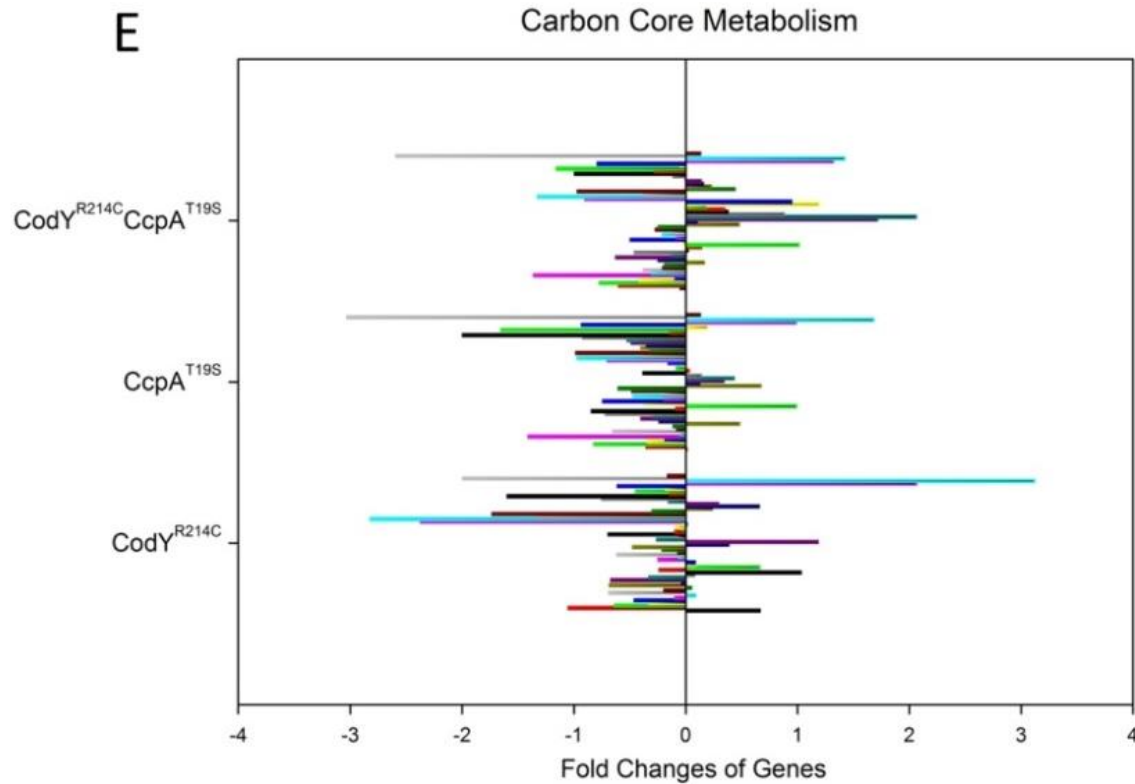
参与氮代谢的特定操纵子的增强转录与β-半乳糖苷酶产生正相关



与WT菌株相比，绝大多数CodY调节子成员和氮代谢相关基因在具有CodY和/或CcpA的DNA结合区突变的菌株中上调或未改变。

3

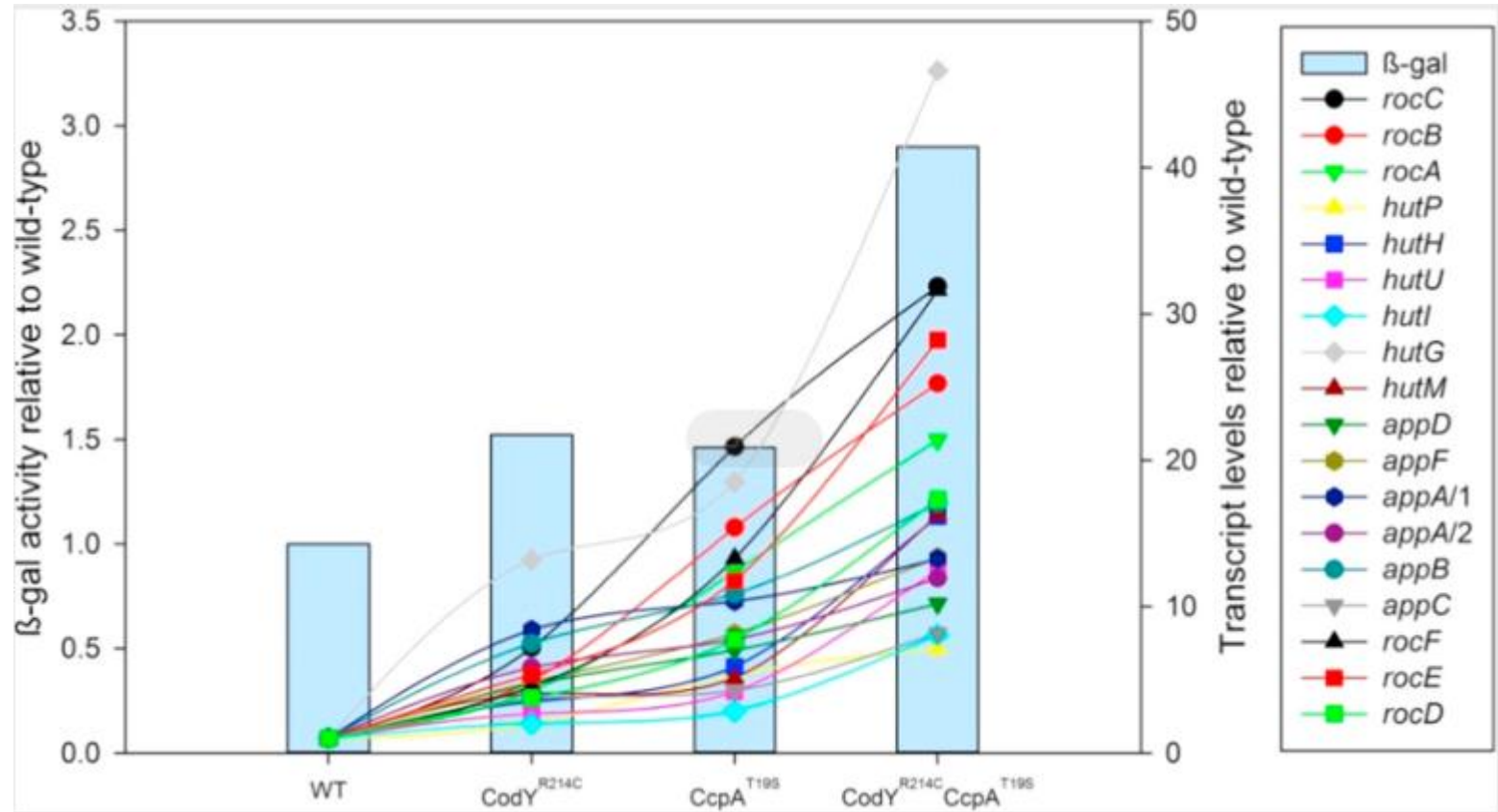
参与氮代谢的特定操纵子的增强转录与 β -半乳糖苷酶产生正相关



相反，来自中心碳代谢的基因表达水平的总体波动是适度的；大多数基因略微下调，只有少数基因表达比WT高2倍。

3

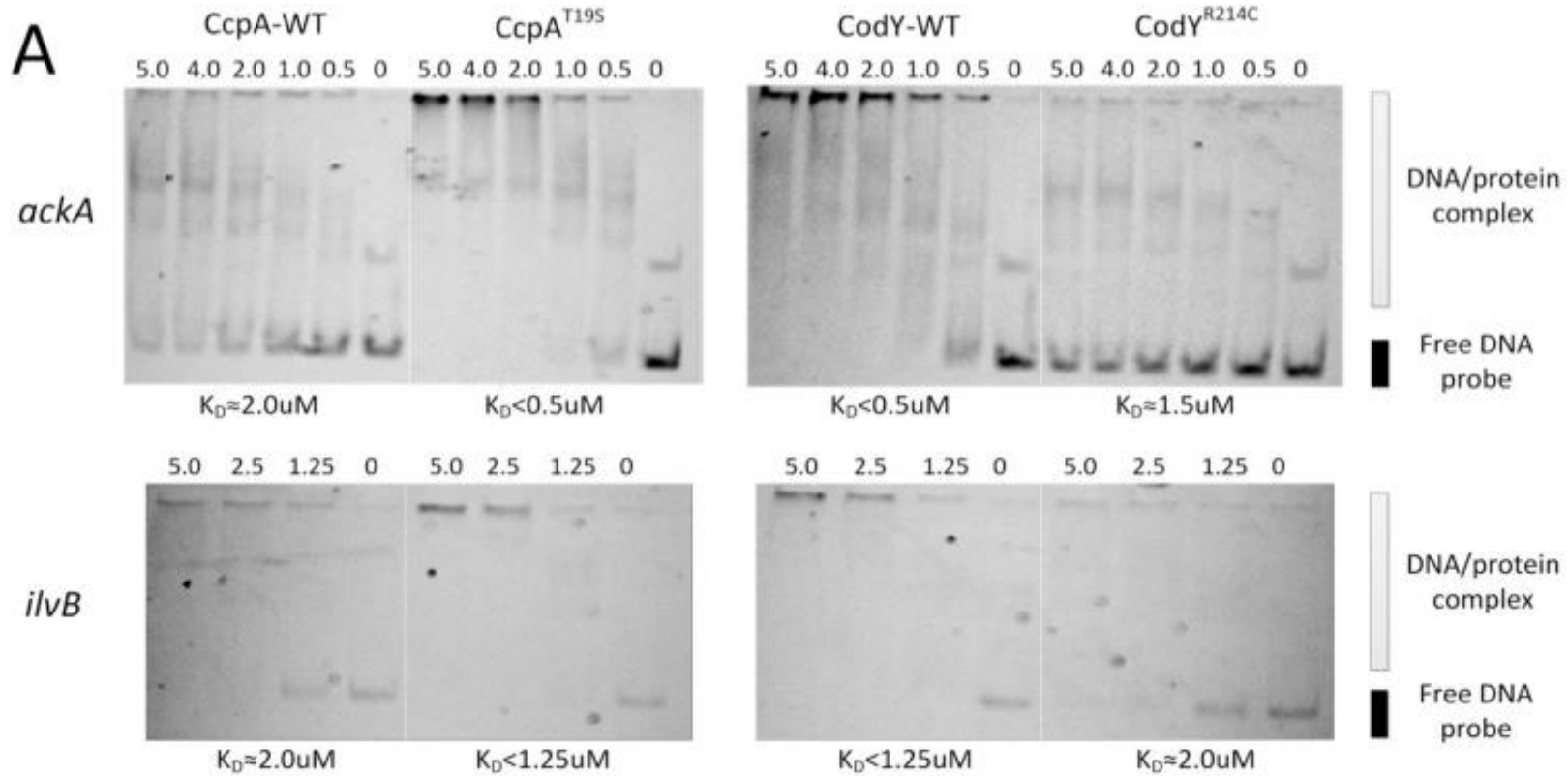
一组特定的基因簇与HTH结构域突变株中的β-半乳糖苷酶生产性能正相关



CodY^{R214C}和CcpA^{T19S} 分别促进了用于养分吸收和利用的特定途径的，CodY和CcpA 的保守DNA结合基序的突变显著增强了特定操纵子的表达，改变的表达，并且这些益处双突变宿主中明显具有协同作用。

3

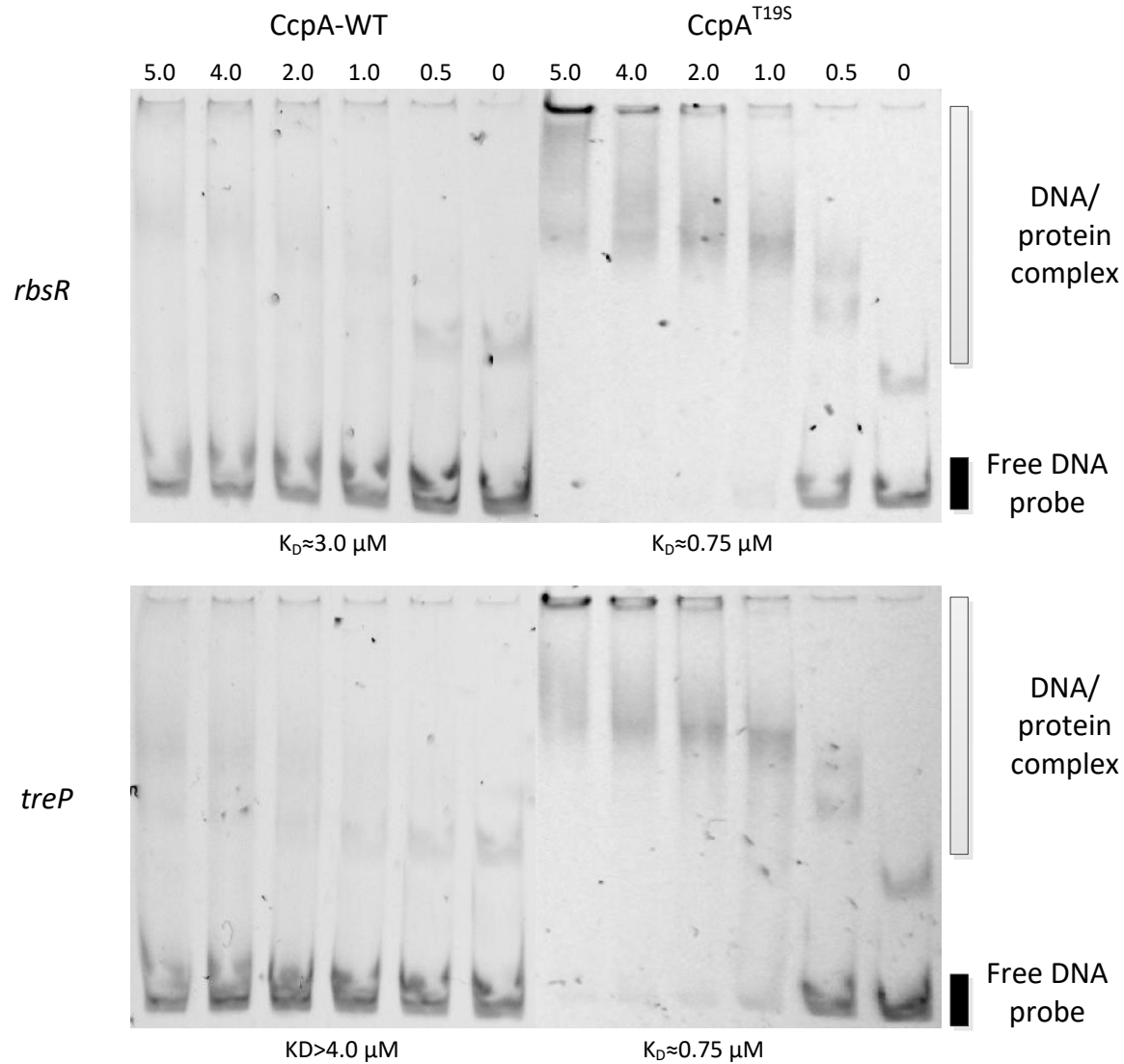
电泳迁移率变动分析 (EMSA)



所有蛋白变体能够结合到所选择的DNA探针。与其WT蛋白相比，CodY^{R214C}和CcpA^{T19S}突变体分别与几个调节位点结合的效率降低和增加。

3

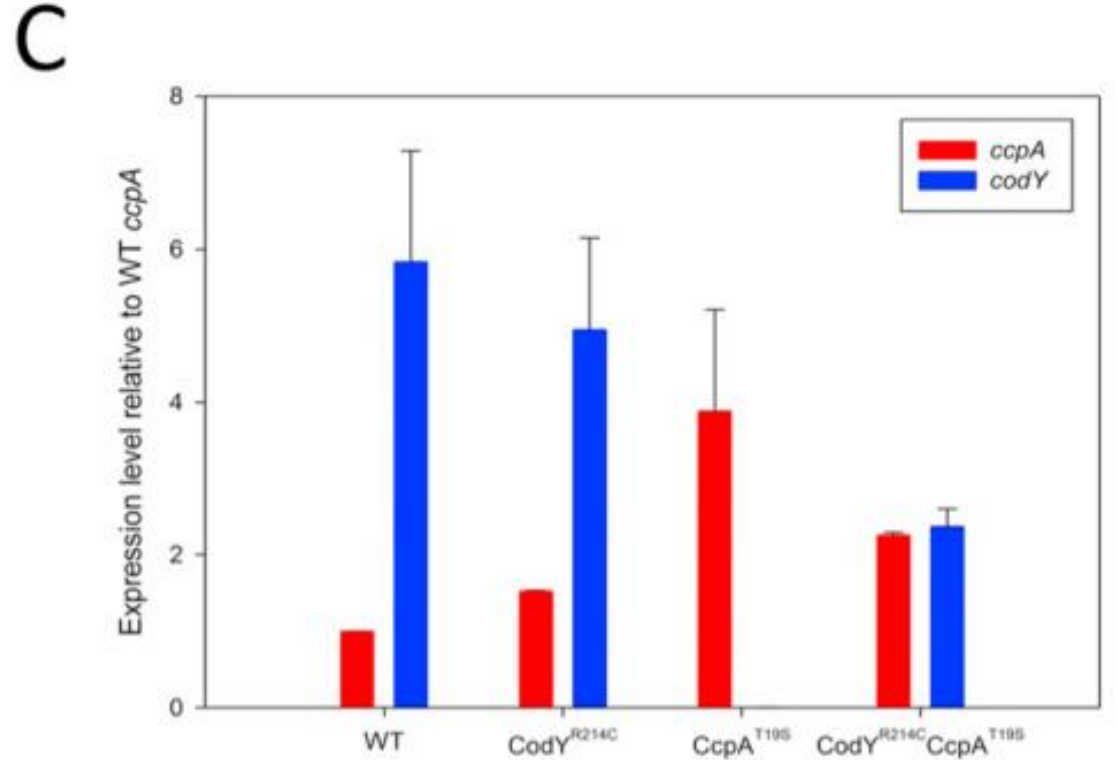
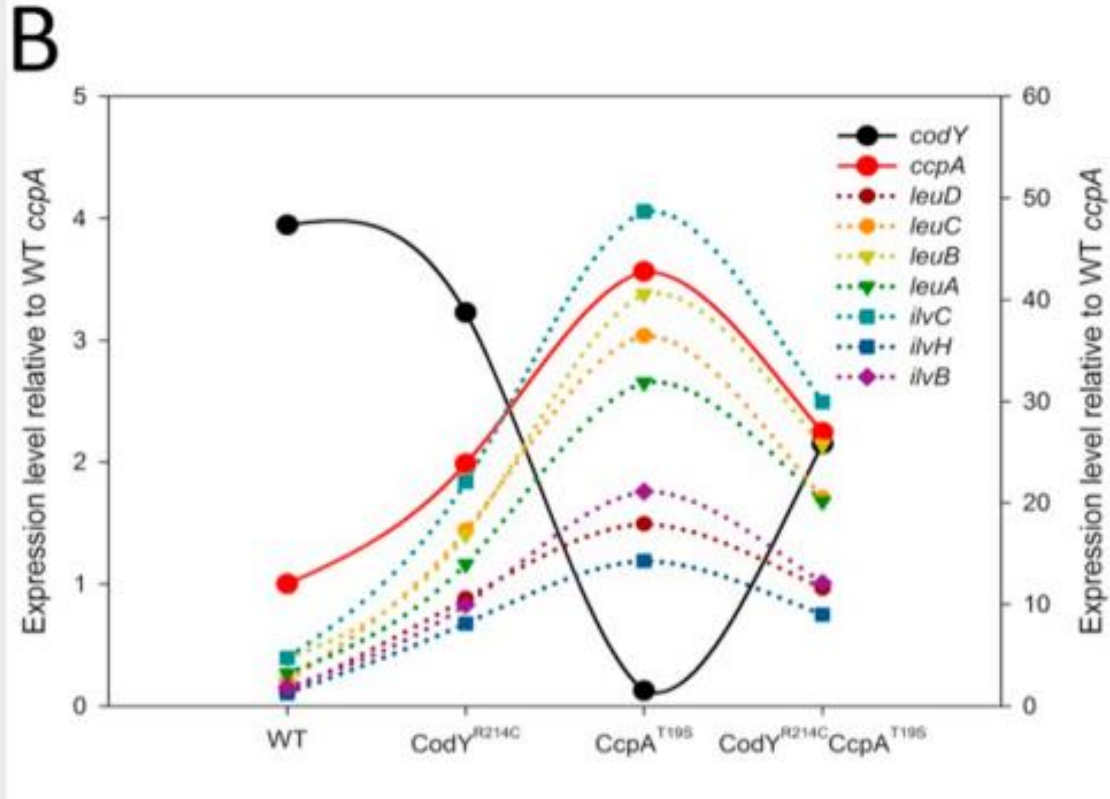
电泳迁移率变动分析 (EMSA)



在CcpA的直接阴性对照下，突变T19S显著提高了CcpA与*rbsR*和*treP*启动子区域的结合效率。

3

CodY和CcpA在重编程的HTH结构域突变体中差异表达

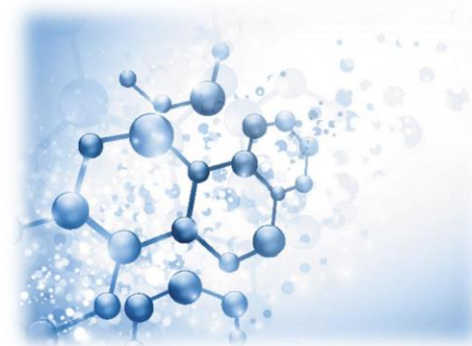


据推测，这是调节效率和表达能力发生变化的两种调节剂之间的相互作用的结果。

1 小结

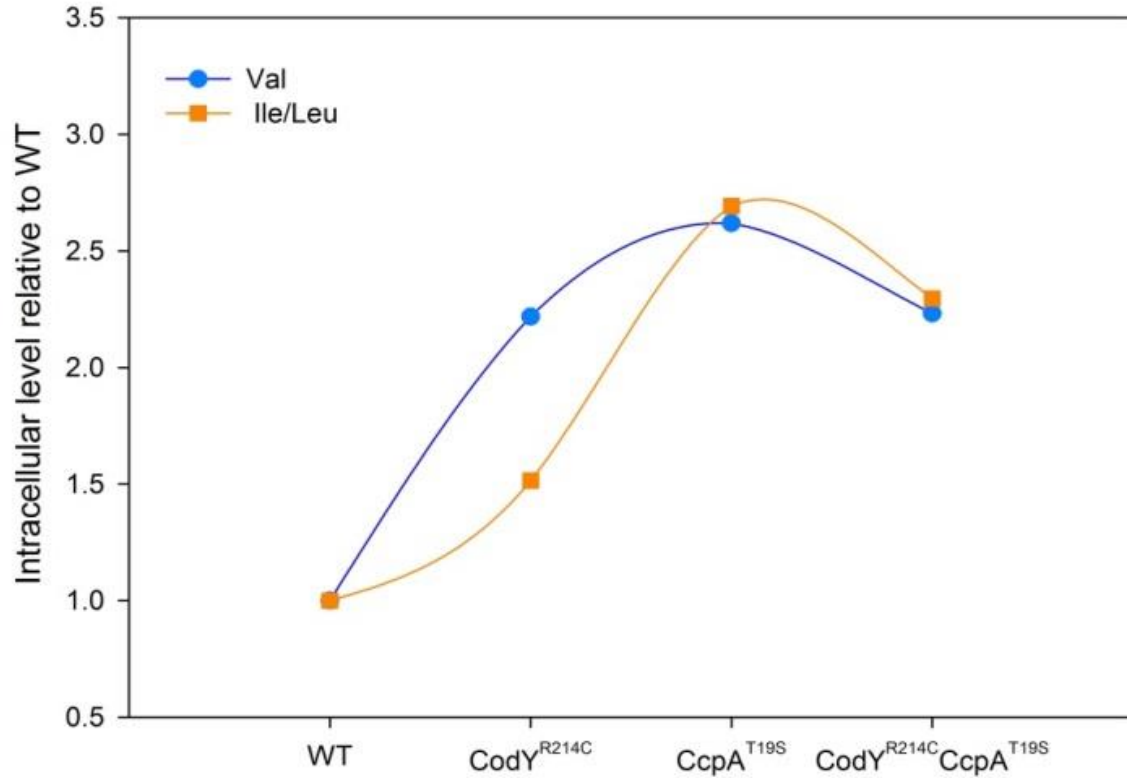
细菌倾向于通过这两种调节剂的表达变化改变整体代谢网络通量，以满足异源蛋白质过量产生的资源需求。

增加的CcpA和降低的CodY蛋白水平导致碳代谢的抑制增强和氮代谢网络中反应的扩增，因此重编程的代谢网络明显有利于 β -半乳糖苷酶的生物合成。



3

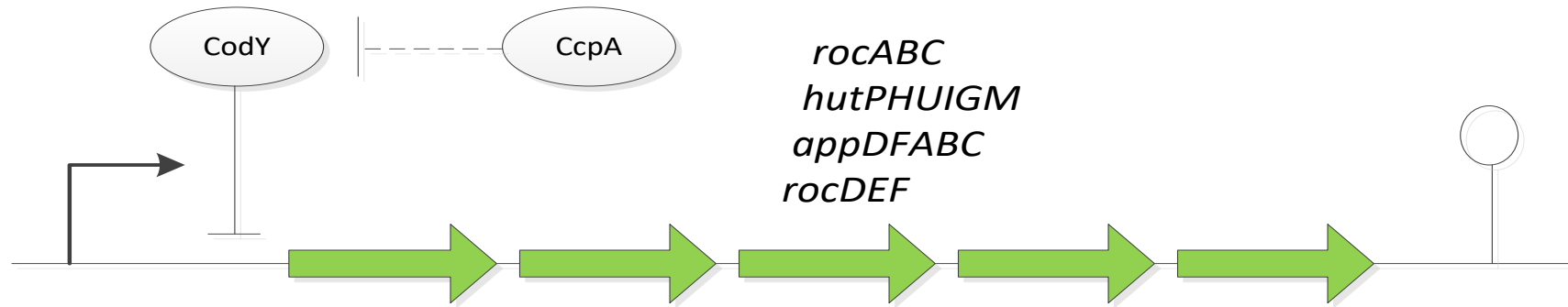
CcpA^{T19S}通过影响辅因子可用性和CodY的自动调节表达环来促进β-半乳糖苷酶的合成



通过LC-MS测量的BCAAs, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸的细胞内水平与各种菌株中相应的转录物丰度水平一致。

3

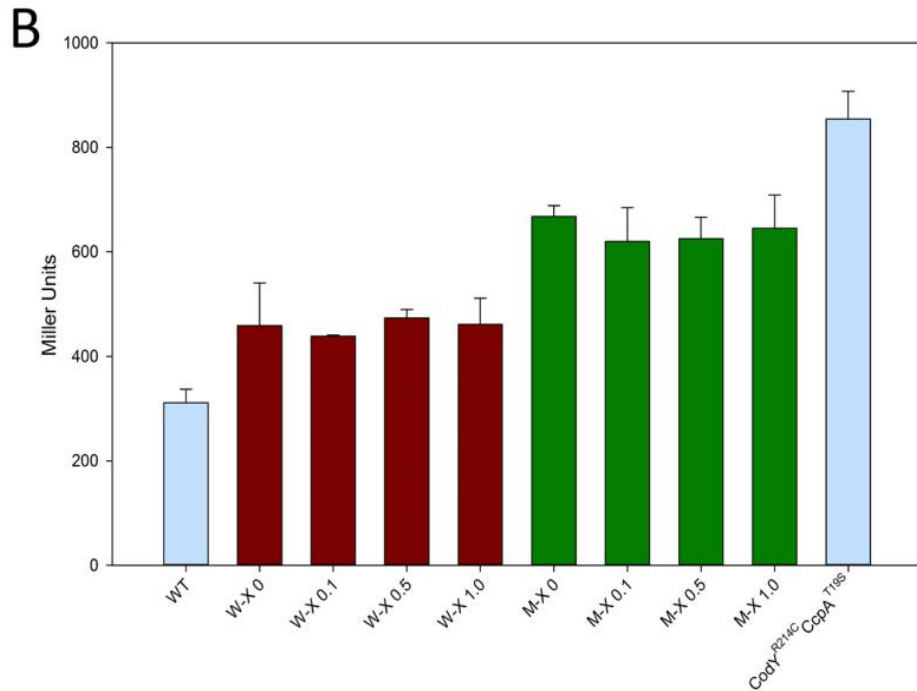
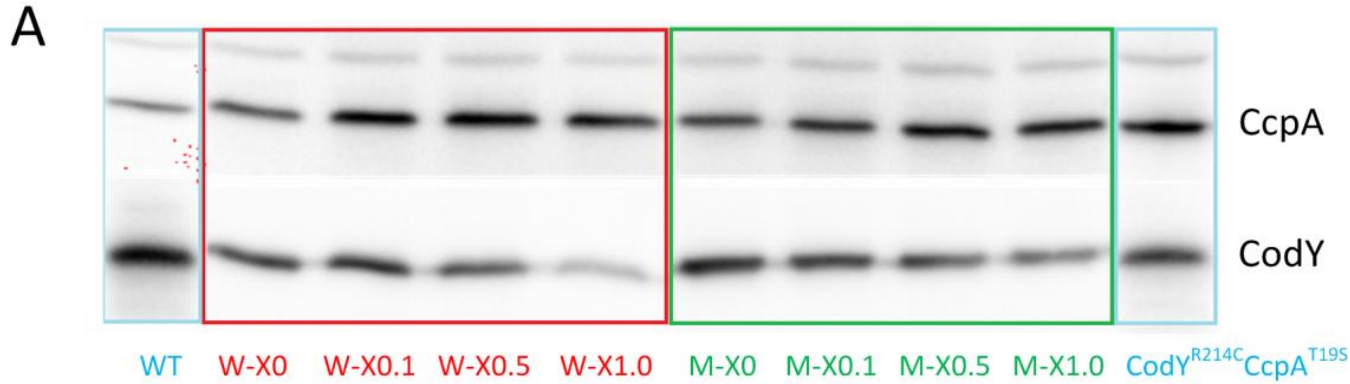
CcpA^{T19S}通过影响辅因子可用性和CodY的自动调节表达环来促进β-半乳糖苷酶的合成



CodY^{R214C}和/或CcpA^{T19S}菌株中β-半乳糖苷酶产量的增加与几种CodY调节的操纵子的转录本丰度密切相关，这显然是由CcpA^{T19S}介导的间接去阻遏引起的（通过间接抑制转录和活性）。

3

CcpA^{T19S}通过影响辅因子可用性和CodY的自动调节表达环来促进β-半乳糖苷酶的合成

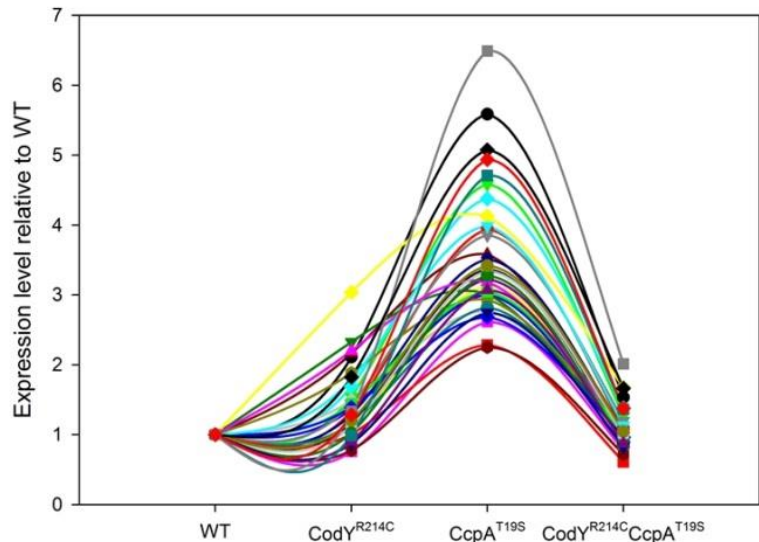


这两个因素表明主调节剂对β-半乳糖苷酶产生的结合亲和力的改变比绝对调节蛋白水平更重要。

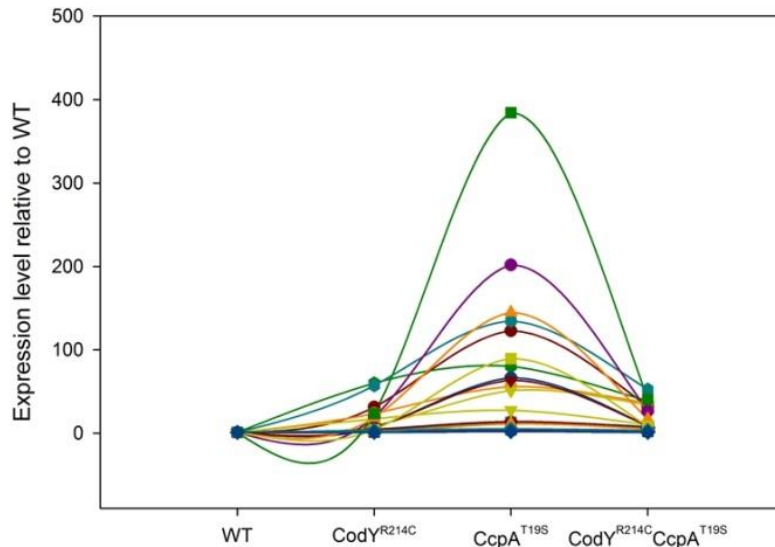
3

氮代谢的基因调控网络在高容量生产突变体中比碳代谢网络更受影响

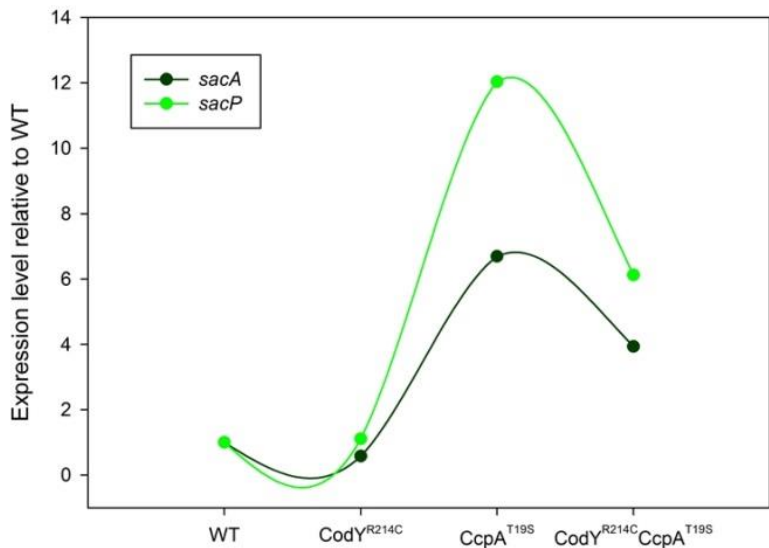
A



B



C



CodY调节的基因对相应调节剂水平的变化更敏感地反应，而CcpA调节子基因的表达水平在所有HTH结构域突变体菌株中保持相当稳定。



Conclusion

4 Conclusion

在本研究中，作者开发了gTME和高通量筛选的工具包，证明其在增加微生物细胞工厂产量方面优于传统方法。从理论上讲，这种量身定制的系统通过实现整个转录组和代谢组的多重同时扰动，提供了过表达任何异源蛋白质的潜力。

通过重新配置中枢代谢调节来显着提高枯草芽孢杆菌的生产力，这促进了正常细胞与异源蛋白质生产需求之间资源分布的良好平衡，对于工业应用和基础研究都具有广泛的意义。

The background features three horizontal, overlapping brushstrokes in a vibrant green color, creating a textured, artistic effect. The strokes are positioned on the left side of the page, with the year '2019' centered over them.

2019

请各位老师同学批评指正！