

• 天然产物生物合成 •

王崇龙 苏州大学医学部基础医学与生物科学学院副教授。2011 年于韩国庆尚大学获得理学博士学位后留校任助理教授，2016 年履职苏州大学工作至今。长期从事微生物代谢工程设计和合成生物学元件开发等研究工作。近年来的研究聚焦于大肠杆菌底盘的适应性和鲁棒性改造以应用于有用萜类化学品的高效合成。已经发表高水平论文 40 余篇，授权发明专利 7 项；主持和参与国家自然科学基金、国家重点研发课题、中韩国际合作课题多项。



环氧角鲨烯合成通路在大肠杆菌中的构建和优化

邵喜喜, 孟云鹤, 周沈婷, 刘欣婷, 蒋慧姝, 效啸, 杨京, 卫功元, 王崇龙

苏州大学 基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123

邵喜喜, 孟云鹤, 周沈婷, 等. 环氧角鲨烯合成通路在大肠杆菌中的构建和优化. 生物工程学报, 2021, 37(6): 2105-2115.

Shao XX, Meng YH, Zhou ST, et al. Construction and optimization of squalene epoxide synthetic pathway in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2021, 37(6): 2105-2115.

摘 要: 三萜类化合物是一类广泛应用于医药、保健和化妆品等行业的天然产物, 具有巨大的商业价值。生物合成三萜类化合物依赖于环氧角鲨烯的高效合成。角鲨烯环氧化酶是整个合成途径中的关键酶, 其催化 NADPH 依赖的环氧化反应将角鲨烯转变为环氧角鲨烯。通过筛选不同来源的角鲨烯环氧化酶, 截短的大鼠角鲨烯环氧化酶 (RnSE_{TC}) 在大肠杆菌 *Escherichia coli* 工程菌中表现出最强的活性; 进一步考察内源性细胞色素 P450 还原酶样 (CPRL) 蛋白对环氧角鲨烯合成的影响显示, 在中度拷贝质粒上以 Lac 启动子调控 NADH: 醌氧化还原酶 (WrbA) 的表达使得环氧角鲨烯产量提高近 2.5 倍。研究结果表明, 所构建的环氧角鲨烯合成途径可以在大肠杆菌中实现三萜类合成关键前体环氧角鲨烯的合成, 为生物合成三萜类化合物提供了重要借鉴。

关键词: 环氧角鲨烯, 角鲨烯环氧化酶, 类细胞色素 P450 还原酶蛋白, 大肠杆菌

Received: December 18, 2020; **Accepted:** March 18, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21878198), Undergraduate Training Program for Innovation and Entrepreneurship, Soochow University (No. 2019xj073).

Corresponding author: Chonglong Wang. Tel: +86-512-65880421; Fax: +86-512-65880103; E-mail: clwang@suda.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21878198), 苏州大学“大学生创新创业训练计划” (No. 2019xj073) 资助。

网络出版时间: 2021-04-02

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210401.1534.001.html>

Construction and optimization of squalene epoxide synthetic pathway in *Escherichia coli*

Xixi Shao, Yunhe Meng, Shenting Zhou, Xinting Liu, Huishu Jiang, Xiao Xiao, Jing Yang, Gongyuan Wei, and Chonglong Wang

School of Biology and Basic medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China

Abstract: Triterpenoids are a class of natural products of great commercial value that are widely used in pharmaceutical, health care and cosmetic industries. The biosynthesis of triterpenoids relies on the efficient synthesis of squalene epoxide, which is synthesized from the NADPH dependent oxidation of squalene catalyzed by squalene epoxidase. We screened squalene epoxidases derived from different species, and found the truncated squalene epoxidase from *Rattus norvegicus* (RnSE_{TC}) showed the highest activity in engineered *Escherichia coli*. Further examination of the effect of endogenous cytochrome P450 reductase like (CPRL) proteins showed that overexpression of NADH: quinone oxidoreductase (WrbA) under Lac promoter in a medium-copy number plasmid increased the production of squalene epoxide by nearly 2.5 folds. These results demonstrated that the constructed pathway led to the production of squalene epoxide, an important precursor for the biosynthesis of triterpenoids.

Keywords: squalene epoxide, squalene epoxidase, CPR-like, *Escherichia coli*

萜类化合物是一类在自然界广泛分布、具有重要的生理和药理活性的天然化合物^[1-2]。按照其所包含的异戊二烯五碳 (C₅) 单位数目的不同, 可分为单萜、倍半萜、二萜、三萜、四萜等。其中, 角鲨烯 (Squalene) 是许多三萜类化合物生物合成的前体物质, 三萜类化合物合成途径通常起始于环氧角鲨烯 (Squalene epoxide) 的形成。环氧角鲨烯再经一系列环化酶的催化下形成不同的三萜碳骨架, 如齐墩果烷 (Oleanane) 型、乌苏烷 (Ursane) 型、木栓烷 (Friedelane) 型、羽扇豆烷 (Lupane) 型等五环三萜类, 它们进一步通过酰化、糖基化或氧化修饰形成各种各样的三萜类化合物衍生物 (图 1)。这些衍生物已经被广泛用于医药、保健和化妆品等行业, 具有可期的商业应用价值。例如, 齐墩果烷型衍生物甘草酸 (Glycyrrhizin) 具有消炎、促进膜再生的功效, 对许多炎症和肝病、肺病有良好的治疗效果^[3-4]; 木栓烷型雷公藤红素 (Celastrol) 是一种有效的肿瘤增殖、侵袭与转移抑制剂, 可有效抑制各种癌细胞 (例如乳腺癌和前列腺癌等) 的增殖, 从而抑制其侵袭和转移^[5-7]。

然而, 三萜类化合物在天然植物内的合成极其微量, 而且植物宿主生长相对缓慢、生长周期长, 这使得采取植物原料提取和分离的生产方式受到了极大的挑战^[8-9]。此外, 由于它们结构所具有的多样性、相似性和复杂性^[10], 三萜类化合物的化学合成同样困难重重。例如, 以 10,11-环氧金合欢烯基乙酸酯和格氏试剂为原料耦合, 再经多步立体选择性环化和扩环反应可实现从头合成包含 10 个手性中心的羽扇豆醇 (Lupeol), 然而合成效率只有约 3% 左右^[11]。这些因素严重限制了三萜类化合物在各领域的广泛应用。合成生物学和代谢工程学的兴起使得在常见表达宿主中重新设计和构建天然产物代谢途径成为可能。大肠杆菌作为研究最为广泛的模式生物, 因其基因组小、结构简单和基因编辑简便等特点, 受到越来越多的代谢工程师们的青睐。迄今为止, 大肠杆菌已经被开发用于合成多种萜类化合物, 包括异戊二烯 (Isoprene)^[12-13]、金合欢烯 (Farnesene)^[14]、紫穗槐二烯 (Amorphadiene)^[15]、紫杉二烯 (Taxadiene)^[16]、 β -胡萝卜素 (β -carotene)^[17-19]等。同样, 研究人员也进行了以大肠杆菌为底盘合成角鲨

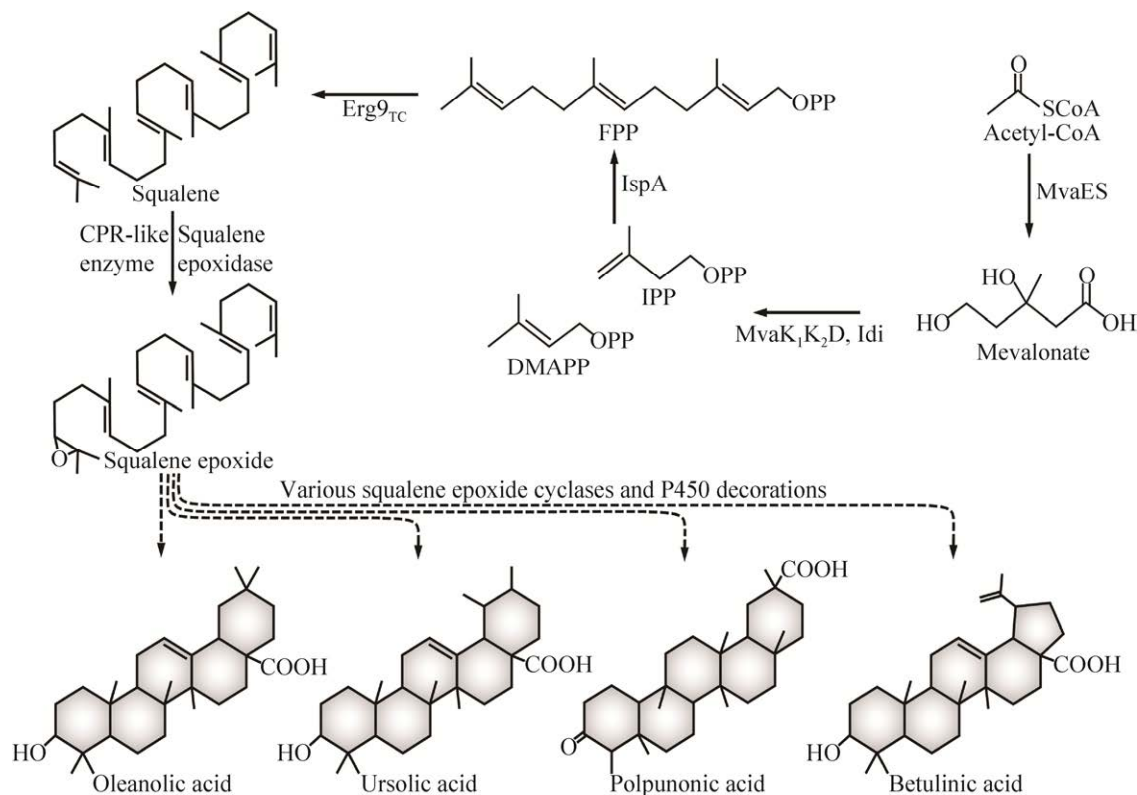


图1 环氧角鲨烯在大肠杆菌工程菌中的合成途径

Fig. 1 Biosynthetic pathway of squalene epoxide in the engineered *E. coli*.

烯的尝试^[20-22]。我们先前的研究将酵母角鲨烯合成酶 (Erg9) 和大肠杆菌金合欢烯焦磷酸 (Farnesyl diphosphate) 合成酶 (IspA) 串联构建角鲨烯合成通路, 再将其与甲羟戊酸 (Mevalonate, MVA) 途径共同导入大肠杆菌中实现角鲨烯的合成, 还通过筛选和过表达大肠杆菌膜蛋白 Tsr 诱导增大细胞膜面积将角鲨烯产量提高到 612 mg/L, 建立了高效合成角鲨烯的大肠杆菌底盘细胞^[23]。

以此为基础, 继续延伸合成途径就可实现三萜类化合物在大肠杆菌中的异源合成。然而, 角鲨烯环氧化酶 (Squalene epoxidase) 催化角鲨烯形成 2,3-环氧角鲨烯是整个通路中的第一个重要限速环节。角鲨烯环氧化酶是一种非细胞色素 P450 酶系 (Cytochrome P450, CYP450) 的环氧化烯烃酶。它不含有血红素, 活性位点不需要结合金属离子。然而, 该酶促反应处除需要分子氧 [O] 外, 还需要辅因子 FAD、NAD(P)H 参与。其

催化过程同某些细胞色素 P450 酶系反应一样, 还原型黄素蛋白接受分子氧 [O] 形成亲电体, 再将分子氧 [O] 传递给角鲨烯产生环氧角鲨烯。但是氧化型黄素蛋白需要在细胞色素 P450 还原酶 (CYP450 reductase, CPR) 作用下以 NAD(P)H 为电子供体偶联还原。因此, 本研究设想在大肠杆菌宿主中筛选有活性的角鲨烯环氧化酶及内源性 CPR 样 (CPR-like, CPRL) 辅助因子, 构建和优化环氧角鲨烯合成平台, 为“绿色制造”更多的三萜类化合物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒构建

由乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 起始合成异戊烯基焦磷酸 (Isoprenyl diphosphate, IPP) 和二甲基丙烯基焦磷酸 (Dimethylallyl diphosphate, DMAPP) 的完整 MVA 途径表达载体 pSNA、由

MVA 起始合成 IPP 和 DMAPP 的下游 MVA 途径表达载体 pSMvL2 为本实验室保存^[24]。

通过聚合酶链反应 (PCR) 从酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* S288c 基因组扩增 *erg1* 基因片段^[25], 并通过上下游引物引入的 *Sal* I 和 *Hind* III 限制性内切酶位点, 将其亚克隆至质粒 pTispA $erg9_{TC}$ ^[23] 构建表达载体 pTSQErg1。同样, 从酿酒酵母 S288c 基因组扩增 *ncp1* 基因片段, 将其亚克隆至 pTSQErg1 的 *Hind* III 和 *Xho* I 位点之间, 构建含有 CPR 的表达载体 pTSQErg1Ncp1。将截短型酿酒酵母角鲨烯合成酶基因 *erg9_{TC}* 用 *Bam*HI 和 *Sal* I 限制性内切酶消化后, 亚克隆至 pSMvL2 构建 pSMLSQ。

按照大肠杆菌密码子偏好性合成荚膜甲基球菌 *Methylococcus capsulatus* 角鲨烯环氧化酶基因 *mcSE*、*Fluviicola taffensis* 菌角鲨烯环氧化酶基因 *ftSE*、截短

型大鼠 *Rattus norvegicus* 角鲨烯环氧化酶基因 *rnSE_{TC}*, 并在所合成基因上下游分别引入 *Bam*HI 和 *Bgl*II、*Sal* I 限制性内切酶位点, 再亚克隆至 pTrc99A 载体构建 pTMcSE、pTFtSE 和 pTRnSE_{TC}。

通过 PCR 从大肠杆菌 MG1655 基因组扩增 7 个 CPRL 基因, NAD(P)H 依赖性醌氧化还原酶基因 *ytfG*^[26]、NADPH: 醌氧化还原酶基因 *mdaB*^[27]、黄素还原酶基因 *fre*^[28]、铁螯合还原酶基因 *yqjH*^[29]、硫氧还蛋白还原酶基因 *trxB*、NADPH 依赖性 FMN 还原酶基因 *ssuE*^[30]、NADH: 醌氧化还原酶基因 *wrbA*^[31], 并通过上下游引物引入 *Bam*HI 和 *Sal* I (或 *Xho* I) 限制性内切位点, 分别克隆至 pTRnSE_{TC} 构建 pTRnSE_{TC}CPRL 系列载体。同样, 将上述 CPRL 相关基因 (*ytfG* 等) 克隆至 pSMLSQ 构建成 pSMLSQ-CPRL 系列载体。本研究所构建的质粒与引物详细信息见表 1 和表 2。

表 1 本研究中所用的质粒

Table 1 Plasmids used in this study

Plasmids	Descriptions	References
pTispA $erg9_{TC}$	pTrc99A containing <i>E. coli</i> FPP synthase gene (<i>ispA</i>) and truncated <i>S. cerevisiae</i> squalene synthase gene (<i>erg9</i>) for squalene synthesis	[23]
pTSQErg1	pTispA $erg9_{TC}$ containing <i>S. cerevisiae</i> squalene epoxidase gene (<i>erg1</i>)	This study
pTSQErg1Ncp1	pTispA $erg9_{TC}$ containing <i>erg1</i> and putative <i>S. cerevisiae</i> CPR gene (<i>ncp1</i>)	This study
pTMcSE	pTrc99A containing <i>M. capsulatus</i> squalene epoxidase gene (<i>mcSE</i>)	This study
pTFtSE	pTrc99A containing <i>F. taffensis</i> squalene epoxidase gene (<i>ftSE</i>)	This study
pTRnSE _{TC}	pTrc99A containing truncated <i>R. norvegicus</i> squalene epoxidase gene (<i>rnSE_{TC}</i>)	This study
pTRnSE _{TC} YtfG	pTRnSE _{TC} containing <i>E. coli</i> gene (<i>ytfG</i>)	This study
pTRnSE _{TC} MdaB	pTRnSE _{TC} containing <i>E. coli</i> gene (<i>mdaB</i>)	This study
pTRnSE _{TC} Fre	pTRnSE _{TC} containing <i>E. coli</i> gene (<i>fre</i>)	This study
pTRnSE _{TC} YqjH	pTRnSE _{TC} containing <i>E. coli</i> gene (<i>yqjH</i>)	This study
pTRnSE _{TC} TrxB	pTRnSE _{TC} containing <i>E. coli</i> gene (<i>trxB</i>)	This study
pTRnSE _{TC} SsuE	pTRnSE _{TC} containing <i>E. coli</i> gene (<i>ssuE</i>)	This study
pTRnSE _{TC} WrbA	pTRnSE _{TC} containing <i>E. coli</i> gene (<i>wrbA</i>)	This study
pSNA	pSTV28 containing <i>S. pneumoniae</i> <i>mvaK₁DK₂</i> operon, <i>E. faecalis</i> <i>mvaES</i> , and <i>E. coli</i> <i>idi</i> gene for generation of IPP and DMAPP from Acetyl-CoA	[23]
pSMvL ₂	pSTV28 containing <i>S. pneumoniae</i> <i>mvaK₁DK₂</i> operon and <i>E. coli</i> <i>idi</i> gene for generation of IPP and DMAPP from mevalonate	[24]
pSMLSQ	pSMvL ₂ containing <i>E. coli</i> FPP synthase gene (<i>ispA</i>) and truncated <i>S. cerevisiae</i> squalene synthase gene (<i>erg9</i>) for squalene synthesis from mevalonate	This study
pSMLSQYtfG	pSMLSQ containing <i>E. coli</i> gene (<i>ytfG</i>)	This study
pSMLSQMdaB	pSMLSQ containing <i>E. coli</i> gene (<i>mdaB</i>)	This study
pSMLSQFre	pSMLSQ containing <i>E. coli</i> gene (<i>fre</i>)	This study
pSMLSQYqjH	pSMLSQ containing <i>E. coli</i> gene (<i>yqjH</i>)	This study
pSMLSQTrxB	pSMLSQ containing <i>E. coli</i> gene (<i>trxB</i>)	This study
pSMLSQSsuE	pSMLSQ containing <i>E. coli</i> gene (<i>ssuE</i>)	This study
pSMLSQWrbA	pSMLSQ containing <i>E. coli</i> gene (<i>wrbA</i>)	This study

表 2 本研究中所用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'-3')	Restriction enzymes
Erg1-sal-F	CTAGTCGACAGAAGGAGATATACATATGTCTGCTGTTAACGTTGCAC	(Sal I)
Erg1-hindxho-R	GAGAAGCTTCTCGAGTTAACCAATCAACTACCAAAC	(Hind III, Xho I)
NCP1-xho-F	CTACTCGAGAAGGAGATATACATATGCCGTTTGGGAATAGACAACAC	(BamH I)
NCP1-hind-R	GAGAAGCTTACCAGACATCTTCTTGGTATC	(Hind III)
yqjH-bam-F	GCGGATCCAAGGAGATAACAATGAATAACACCC	(BamH I)
yqjH-sal-R	AGTGTCTGACTTACTTTGCGTGCCAGTAAGC	(Sal I)
ssuE-bam-F	GCGGATCCAGGAGAAATATATGCGTGTCATCACCTGGC	(BamH I)
ssuE-sal-R	AGTGTCTGACGATGTTACGCATGGGCATTACC	(Sal I)
wrbA-bam-F	GCGGATCCAAGGAGATAATAAATGGCTAAAGTTCTGGTGC	(BamH I)
wrbA-sal-R	AGTGTCTGACGCATGCGTATCCTCTGTG	(Sal I)
ytfG-bam-F	GCGGATCCAAGGAGAATATAAATGATCGCTATTACTGGTGCC	(BamH I)
ytfG-sal-R	AGTGTCTGACGTCATTATCAGAGAGGATGC	(Sal I)
mdaB-bam-F	GCGGATCCAAGGAGAATATAAATGAGCAACATCCTGATTATC	(BamH I)
mdaB-sal-R	CGTGTCTGACAAGCCTGAGCTCTAGTTAAC	(Sal I)
fre-bam-F	GCGGATCCAAGGAGAATATAAATGACAACCTTAAGCTGTAAAGTG	(BamH I)
fre-xho-R	GATCTCGAG CCGTTCTTCCCGCCTGTCTAG	(Xho I)
trxB-bam-F	GCGGATCCAAGGAGAATATAAATGGGCACGACCAAACACAG	(BamH I)
trxB-sal-R	CGTGTCTGACCATAGTCGCATGGTGTCTGC	(Sal I)

The restriction enzymes are listed after each sequence and the digestion sites are underlined.

1.2 菌株和培养条件

大肠杆菌 DH5 α 用作质粒克隆和环氧角鲨烯合成的宿主菌。挑取的重组大肠杆菌菌落于 LB 培养基 (胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、氯化钠 10 g/L) 中, 在 37 °C 恒温气浴摇床中, 以 200 r/min 振荡培养 12 h 后用于质粒的克隆和扩增。分别将所构建的环氧角鲨烯合成模块质粒和 IPP/DMAPP 供给质粒共同转化到大肠杆菌 DH5 α 中构建各环氧角鲨烯工程菌株, 其详细信息见表 3。培养环氧角鲨烯工程菌时, 首先挑取单克隆于 2YT 培养基 (胰蛋白胨 16 g/L、酵母提取物 10 g/L、氯化钠 5 g/L) 中, 在 30 °C 恒温气浴摇床中, 200 r/min 振荡培养 12 h 作为种子液; 再以 0.1% 的接种量接种到含有 2% 甘油(V/V)和 0.1 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 的新鲜 2YT 培养基, 继续在 30 °C 恒温气浴摇床中 200 r/min 振荡培养 48 h 后, 用于环氧角鲨烯的合成检测。培养时根据需要加入氨苄青霉素和 (或) 氯霉素分别至终

浓度 100 mg/L 和 50 mg/L。

1.3 环氧角鲨烯的提取和测定

将 48 h 培养液于 12 000 r/min 离心 1 min 后收集沉淀, 并用一定体积的灭菌水悬浮。悬浮后的样品与等体积的氯仿和甲醇混合, 振荡萃取 1 h; 然后转移上层氯仿相至新离心管中。再用一体积的氯仿以相同的方式萃取一次。使用真空离心浓缩仪从混合液中去除氯仿相, 最后将样品重新溶解于乙酸乙酯中用于气相色谱和质谱分析。

环氧角鲨烯定性、定量分析使用配有 FID 的气相色谱仪 (GC; Agilent Technologies 7890A)。样品以 1 : 10 的分流比注入 19091N-133 HP-INNOWAX 色谱柱 (长度 30 m; 内径 250 μ m; 膜厚 0.25 μ m)。GC 条件如下: 初始烘箱温度为 50 °C, 保持 1 min, 以 5 °C/min 的速率加热至 80 °C, 然后再以 40 °C/min 的速率加热至最终温度 260 °C, 并保持 1 min; 检测器温度保持为 260 °C。在相同的气相色谱条件下, 用气相色谱-

质谱法 (GC-MS; GCMS-2010 Ultra; Shimadzu) 对样品各析出峰进行表征, 数据采集的 m/z 范围为 40–350, 溶剂延迟 cut-off 时间为 2.5 min。

2 结果与分析

2.1 基于酿酒酵母基因的环氧化角鲨烯生物合成途径的构建

先前的研究通过串联截短的酿酒酵母角鲨烯合酶基因 *erg9* (*erg9_{TC}*) 和大肠杆菌 FPP 合酶基因 *ispA*, 构建了角鲨烯合成模块 IspA-Erg9_{TC} (pTispAErg9_{TC})。在此基础上, 环氧角鲨烯合成模块 IspA-Erg9_{TC}-Erg1 (pTSQErg1) 可以通过引入酵母角鲨烯环氧化酶基因 *erg1* 构建。考虑到角鲨烯的环氧化反应需要 CPR 辅因子的参与^[32], 酵

母 NADPH 依赖性 CPR 辅因子基因 *ncp1* 一并与其串联, 构建 pTSQErg1Ncp1 表达载体 (图 2A)。由于甲羟戊酸途径模块表达质粒 pSNA 可在大肠杆菌中利用乙酰辅酶 A 从头合成 IPP 和 DMAPP 前体^[23], 所构建的质粒分别与 pSNA 质粒共转化大肠杆菌 DH5 α , 获取工程菌株 NA-SQE1 和 NA-SQE1-Ncp1; 同时将 pSNA 和 pTispAErg9_{TC} 共转化获取的工程菌株 NA-SQ 作为无法进行环氧角鲨烯合成的对照组。所构建的工程菌培养 48 h 后, 菌体经提取并进行气相色谱 (GC) 分析。如图 2B 所示, 角鲨烯标准品的保留时间约为 10.2 min, 环氧角鲨烯标准品的保留时间约为 12.7 min。工程菌株 NA-SQE1、NA-SQE1-Ncp1 同对照组 NA-SQ 一样, 只在 10.2 min 处出现角鲨

表 3 本研究中所用的菌株

Table 3 Strains used in this study

Strains	Descriptions	References
<i>E. coli</i> DH5 α	F^- , Φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r_K-m_K), <i>Our lab</i>	
NA-SQ	<i>E. coli</i> DH5 α transformed with pSNA and pTispAErg9 _{TC}	This study
NA-SQE1	<i>E. coli</i> DH5 α transformed with pSNA and pTSQErg1	This study
NA-SQE1-Ncp1	<i>E. coli</i> DH5 α transformed with pSNA and pTSQErg1Ncp1	This study
ML-SQE2	<i>E. coli</i> DH5 α transformed with pSMLSQ and pTRnSE _{TC}	This study
ML-SQE3	<i>E. coli</i> DH5 α transformed with pSMLSQ and pTFtSE	This study
ML-SQE4	<i>E. coli</i> DH5 α transformed with pSMLSQ and pTMcSE	This study
ML-SQE2-YtfG-a	<i>E. coli</i> DH5 α transformed with pSMLSQ and pTRnSE _{TC} YtfG	This study
ML-SQE2-MdaB-a	<i>E. coli</i> DH5 α transformed with pSMLSQ and pTRnSE _{TC} MdaB	This study
ML-SQE2-Fre-a	<i>E. coli</i> DH5 α transformed with pSMLSQ and pTRnSE _{TC} Fre	This study
ML-SQE2-YqjH-a	<i>E. coli</i> DH5 α transformed with pSMLSQ and pTRnSE _{TC} YqjH	This study
ML-SQE2-TrxB-a	<i>E. coli</i> DH5 α transformed with pSMLSQ and pTRnSE _{TC} TrxB	This study
ML-SQE2-SsuE-a	<i>E. coli</i> DH5 α transformed with pSMLSQ and pTRnSE _{TC} SsuE	This study
ML-SQE2-WrbA-a	<i>E. coli</i> DH5 α transformed with pSMLSQ and pTRnSE _{TC} WrbA	This study
ML-SQE2-YtfG-b	<i>E. coli</i> DH5 α transformed with pTRnSE _{TC} and pSMLSQYtfG	This study
ML-SQE2-MdaB-b	<i>E. coli</i> DH5 α transformed with pTRnSE _{TC} and pSMLSQMdaB	This study
ML-SQE2-Fre-b	<i>E. coli</i> DH5 α transformed with pTRnSE _{TC} and pSMLSQFre	This study
ML-SQE2-YqjH-b	<i>E. coli</i> DH5 α transformed with pTRnSE _{TC} and pSMLSQYqjH	This study
ML-SQE2-TrxB-b	<i>E. coli</i> DH5 α transformed with pTRnSE _{TC} and pSMLSQTrxB	This study
ML-SQE2-SsuE-b	<i>E. coli</i> DH5 α transformed with pTRnSE _{TC} and pSMLSQSsuE	This study
ML-SQE2-WrbA-b	<i>E. coli</i> DH5 α transformed with pTRnSE _{TC} and pSMLSQWrbA	This study

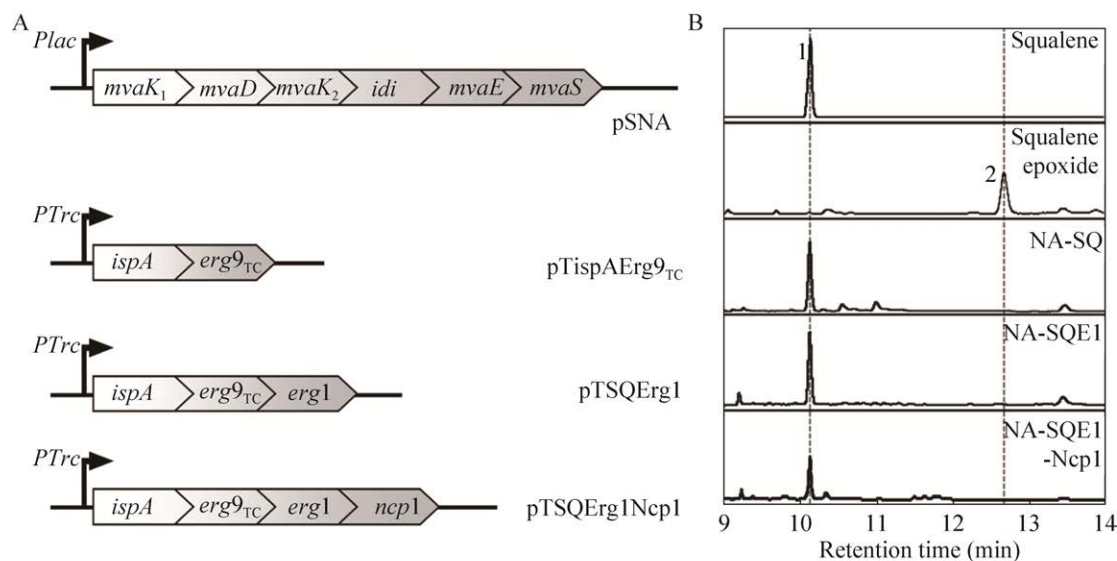


图2 基于酿酒酵母基因的环氧角鲨烯合成模块的构建和性能测试

Fig. 2 Construction and validation of the squalene epoxide biosynthesis module using *S. cerevisiae* genes. (A) Squalene epoxide biosynthesis module. (B) GC validation of the squalene epoxide synthesized.

烯的特征峰,而在 12.7 min 处均没有明显的特征峰。这一结果表明,无论是否引入 CPR 辅因子 Ncp1,所构建的环氧角鲨烯合成模块 IspA-Erg9_{TC}-Erg1 都无法将角鲨烯环氧化形成环氧角鲨烯。我们推测,酵母角鲨烯环氧化酶 Erg1 的活性可能受到大肠杆菌宿主环境的影响,从而导致加氧失败。

2.2 外源角鲨烯环氧化酶在大肠杆菌中的活性筛选

据文献报道,来自荚膜甲基球菌 *M. capsulatus*、*F. taffensis* 菌和大鼠 *R. norvegicus* 的角鲨烯环氧化酶 McSE、FtSE 和 RnSE 可以在大肠杆菌中表达,并表现出环氧化活性^[33-34]。而且,相较于细菌角鲨烯环氧化酶,大鼠角鲨烯环氧化酶 RnSE 的 C 端存在一个跨膜结构域,将其截短可以提高在大肠杆菌中的表达水平^[34]。因此,本研究继续考察了细菌来源的角鲨烯环氧化酶 FtSE、McSE 和截短的 RnSE_{TC} 在大肠杆菌工程菌中对角鲨烯进行加氧的性能。根据大肠杆菌密码子偏好性重新设计的 3 个角鲨烯环氧化酶基因 *rnSE_{TC}*、*ftSE* 和 *mcSE* 被克隆至含有高拷贝数和强启动子的

pTrec99A 载体构建 pTRnSE_{TC}、pTFtSE 和 pTMcSE 质粒;角鲨烯合成模块 IspA-Erg9_{TC} 重新与甲羟戊酸途径下游部分串联构建从甲羟戊酸到角鲨烯的合成模块 (pSMLSQ, 图 3A);pTRnSE_{TC}、pTFtSE 和 pTMcSE 质粒再分别与 pSMLSQ 质粒共同转化于大肠杆菌 DH5α 获得工程菌株 ML-SQE2、ML-SQE3 和 ML-SQE4。培养 48 h 后的样品提取物经 GC 检测发现,除在 10.2 min 有明显的角鲨烯特征峰 (Peak 1[#]) 外,在 12.7 min 处也出现与环氧角鲨烯相同滞留时间的特征峰 (Peak 2[#], 图 3B)。其中,含有大鼠角鲨烯环氧化酶 RnSE_{TC} 的 ML-SQE2 工程菌株表现出最强的特征峰信号。GC-MS 进一步分析显示 Peak 2[#]特征峰质谱图与环氧角鲨烯标准品一致,确为环氧角鲨烯 (图 3C)。这一结果表明,此 3 种角鲨烯环氧化酶在大肠杆菌中均有活性,且其活性受到种属来源特异性的影响;同时,结果也表明大肠杆菌中可能存在 CPRL 辅因子协助角鲨烯环氧化酶共同完成角鲨烯的加氧过程。

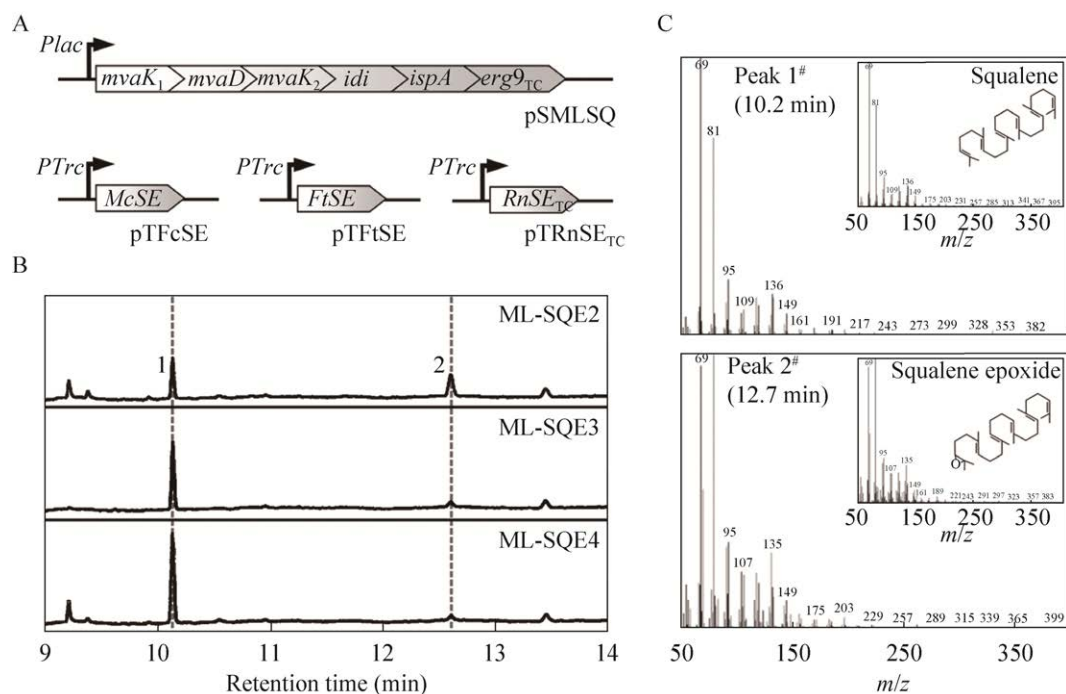


图3 不同来源角鲨烯环氧化酶对氧化鲨烯合成的影响

Fig. 3 Effect of different squalene epoxidases on squalene epoxide production. (A) construction of the squalene epoxidases from different species. (B, C) GC-MS validation of the squalene epoxide synthesized. The spectrums of squalene and squalene epoxide are inserted in Fig. 3C.

2.3 大肠杆菌内源性 CPRL 辅因子对环氧角鲨烯合成的影响

大肠杆菌氧化磷酸化依赖电子传递链上存在的大量电子传递酶及同工酶,例如, NADPH:醌氧化还原酶可催化醌类物质的双电子还原和保护细胞免受单电子还原引起的自由基和活性氧的毒性作用^[35]。这些电子传递酶可以按照不同的方式组合,使得大肠杆菌能以泛醌池为连接点利用多种底物提供和接受电子^[36]。7个电子传递酶(NAD(P)H 依赖性醌氧化还原酶 YtfG、NADPH:醌氧化还原酶 MdaB、黄素还原酶 Fre、铁螯合还原酶 YqjH、硫氧还蛋白还原酶 TrxB、NADPH 依赖性 FMN 还原酶 SsuE、NADH:醌氧化还原酶 WrbA^[26-31]) 被选为候选 CPRL 辅因子,并进行辅助行使角鲨烯环氧化功能的考察。此7个候选基因与表现优异的角鲨烯环氧化酶基因 *rmSE_{TC}* 分别串联构建 pTRnSE_{TC}CPRL 质粒系列(图4A),并

分别与 PMSLQ 质粒共转化于大肠杆菌获得 ML-SQE2-CRPL-a 系列工程菌。各工程菌株培养 48 h 后,其细胞生长量与 ML-SQE2 菌株相比较,除了过表达 MdaB 和 Fre 菌株生长较好外,其余各菌株生长均明显低于 ML-SQE2 菌株;在环氧角鲨烯合成方面,仅过表达 MdaB 和 Fre 的菌株有环氧角鲨烯的生成,但产量降为 ML-SQE2 菌株产量 (15.0 mg/L) 一半左右,其余各菌株环氧角鲨烯产量均低于检测水平(图4B)。由于 ML-SQE2-CRPL-a 系列工程菌中,CPRL 被构建在高拷贝的 pTrc99A 质粒上,同时受到强 Trc 启动子的控制,我们推测,这些氧化还原酶表达量的增加有可能打破了呼吸链原有的稳态,影响细胞正常的能量代谢,从而导致细胞生长受到了抑制。因此,7个候选 CPRL 辅因子被重新构建于受相对较弱的 Lac 启动子控制的中度拷贝 pSMLSQ 质粒,再和 pTRnSE_{TC} 共转化大肠杆菌,获得 ML-SQE2-

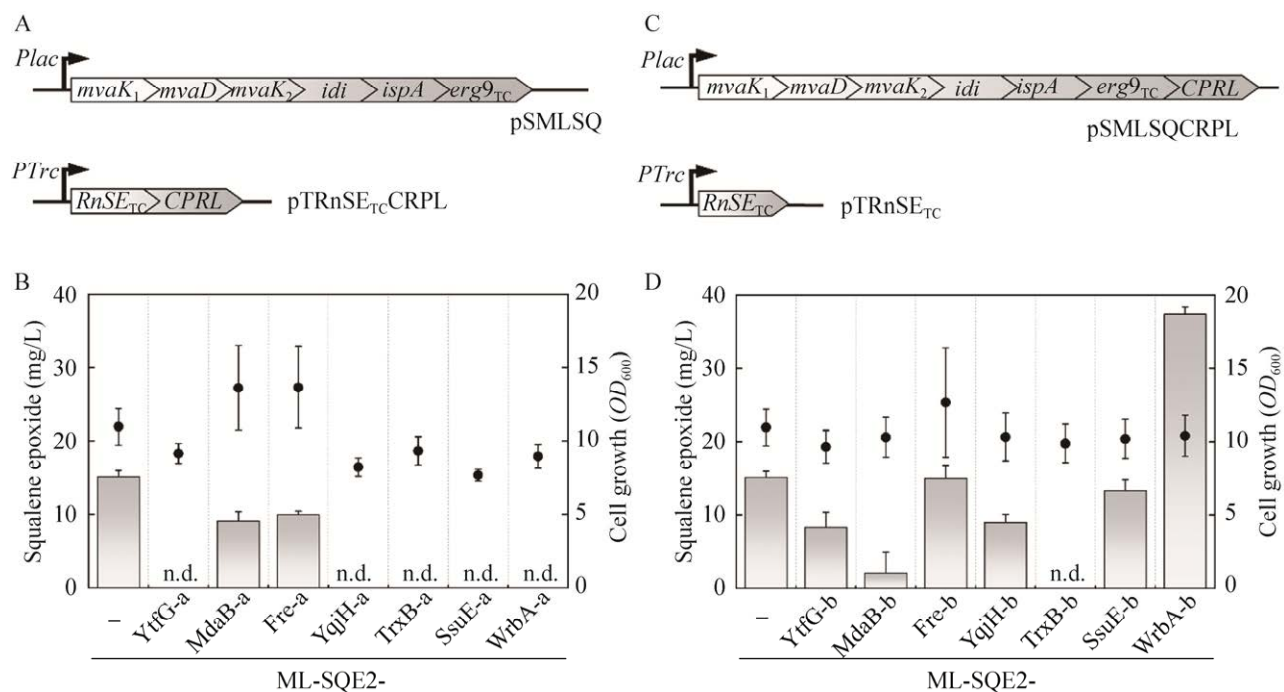


图4 调控 CPRL 的表达量优化环氧角鲨烯合成途径

Fig. 4 Optimization of the squalene epoxide biosynthesis pathway by regulating the expression of CPRLs. (A, C) The construction of CPRL controlled by different promoters. (B, D) Cell growth (dots) and production of squalene epoxide (bars). The “n.d.” indicates “not detected”.

CRPL-b 系列工程菌 (图 4C)。如我们所料, 在相同的培养下, ML-SQE2-CRPL-b 系列工程菌表现出与 ML-SQE2-CRPL-a 系列完全不同的结果。如图 4D 所示, 各菌株细胞生长量与 ML-SQE2 菌株相比没有明显差异; 而且, 除过表达 TrxB 菌株外, 其他各菌株均能合成环氧角鲨烯。其中, 过表达 WrbA 菌株 ML-SQE2-WrbA-b 合成 37.4 mg/L 环氧角鲨烯, 比 ML-SQE2 菌株提高了近 2.5 倍。

3 讨论与结论

为了在大肠杆菌中合成环氧角鲨烯, 本研究首先构建了基于酵母角鲨烯环氧化酶的工程菌株 NA-SQE1 和 NA-SQE1-Ncp1。然而, 它们均没有表现出对角鲨烯加氧的能力, 我们推测大肠杆菌宿主的微环境可能限制了角鲨烯环氧化酶的活性。通过筛选不同物种来源的角鲨烯环氧化酶, 本研究获得的截短大鼠角鲨烯环氧化酶 RnSE_{TC}

在大肠杆菌中具有较高的活性, 可用于代谢工程编辑生产环氧角鲨烯。同时, 尽管在本研究中细菌来源的 McSE、FtSE 没有表现出比 RnSE_{TC} 更高的活性, 但也证实了其在大肠杆菌中环氧化角鲨烯的潜能。此外, 最近的研究报道了利用拟南芥角鲨烯环氧化酶在大肠杆菌中合成三萜骨架达玛烯二醇 II^[37], 文中强调了 CPR 辅因子对角鲨烯环氧化酶的重要性。我们的研究表明, 有些角鲨烯环氧化酶, 例如 McSE、FtSE、RnSE_{TC}, 可以在大肠杆菌中不引入异源辅助因子的情况下发挥加氧作用合成环氧角鲨烯。

本研究从大肠杆菌中电子传递链上 7 个电子传递酶中进行筛选 CPR 辅因子时发现, YtfG、YqjH、TrxB、SsuE、WrbA 的表达水平较高时, 宿主菌的生长受到明显抑制, 也导致工程菌株中环氧角鲨烯的合成能力严重削弱。呼吸链的一个重要功能是维持氧化还原水平的平衡和 NAD⁺

再生。高表达候选 CPRL 可能会打乱电子传递链各酶之间的平衡, 从而影响 TCA 循环和氧化磷酸化等能量代谢途径及代谢产物的合成。通过将 CPRL 候选基因克隆至 ML-SQE2 质粒上, 降低 CPRL 的表达可以协调其与角鲨烯环氧化酶的表达水平。因此, 恰当的 CPRL 表达水平使得 ML-SQE2-WrbA-b 菌株合成环氧角鲨烯能力相比对照组提高了近 2.5 倍, 这一产量是解脂耶氏酵母工程菌所合成环氧角鲨烯的 1.7 倍^[38]。在大肠杆菌中, WrbA 与角鲨烯环氧化酶之间可能具有良好的相容性, 但是更适合的表达水平和 CPRL 仍需要进一步研究, 以提高环氧角鲨烯和三萜类化合物的生物合成。

本研究不仅在大肠杆菌中成功地构建了环氧角鲨烯合成途径, 还揭示了大肠杆菌宿主借助细胞内源性 CPRL 完成角鲨烯的加氧作用, 而且环氧角鲨烯的合成受到 CPRL 表达水平的直接影响。本研究结果可以为代谢工程改造大肠杆菌提高环氧角鲨烯及三萜类化合物产量提供借鉴和参考。

REFERENCES

- [1] Liu H, Zhang Y, Sun SQ, et al. Efficacy of terpenoid in attenuating aortic atherosclerosis in apolipoprotein-E deficient mice: a meta-analysis of animal studies. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 2931831.
- [2] Shi Z, Chen Y, Lu C, et al. Resolving neuroinflammation, the therapeutic potential of the anti-malaria drug family of artemisinin. *Pharmacol Res*, 2018, 136: 172-180.
- [3] Hua SY, Ma MY, Fei XY, et al. Glycyrrhizin attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury by suppressing HMGB1-dependent GSDMD-mediated kupffer cells pyroptosis. *Int Immunopharmacol*, 2019, 68: 145-155.
- [4] Zhang YY, Li LY, Qi C, et al. Glycyrrhizin alleviates Con A-induced hepatitis by differentially regulating the production of IL-17 and IL-25. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 692-699.
- [5] Kashyap D, Sharma A, Tuli HS, et al. Molecular targets of celastrol in cancer: recent trends and advancements. *Crit Rev Oncol*, 2018, 128: 70-81.
- [6] Venkatesha SH, Dudics S, Astry B, et al. Control of autoimmune inflammation by celastrol, a natural triterpenoid. *Pathog Dis*, 2016, 74(6): ftw059.
- [7] Cao L, Zhang X, Cao FF, et al. Inhibiting inducible miR-223 further reduces viable cells in human cancer cell lines MCF-7 and PC3 treated by celastrol. *BMC Cancer*, 2015, 15: 873.
- [8] 张倩茹, 高颖, 李群芳, 等. 杜仲叶环烯醚萜类化合物提取工艺研究. *安徽农业科学*, 2010, 38(8): 4051-4052.
Zhang QR, Gao Y, Li QF, et al. Study on the extraction of iridoids from *Eucommia ulmoides* leaves. *J Anhui Agric Sci*, 2010, 38(8): 4051-4052 (in Chinese).
- [9] 常春, 赵亚南, 曾爱国. 环糊精水提法提取积雪草中的三萜类化合物. *西北药学杂志*, 2018, 33(4): 432-435.
Chang C, Zhao YN, Zeng AG. Extraction of triterpenoids from *Centella asiatica* by cyclodextrin aqueous extraction. *Northwest Pharm J*, 2018, 33(4): 432-435 (in Chinese).
- [10] Jackson H, Braun CL, Ernst H. The chemistry of novel xanthophyll carotenoids. *Am J Cardiol*, 2008, 101(10a): 50D-57D.
- [11] Surendra K, Corey EJ. A short enantioselective total synthesis of the fundamental pentacyclic triterpene lupeol. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(39): 13928-13929.
- [12] Yang JM, Zhao G, Sun YZ, et al. Bio-isoprene production using exogenous MVA pathway and isoprene synthase in *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2012, 104: 642-647.
- [13] Wang CL, Zada B, Wei GY, et al. Metabolic engineering and synthetic biology approaches driving isoprenoid production in *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2017, 241: 430-438.
- [14] Wang CL, Yoon SH, Jang HJ, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for α -farnesene production. *Metab Eng*, 2011, 13(6): 648-655.
- [15] Anthony JR, Anthony LC, Nowroozi F, et al. Optimization of the mevalonate-based isoprenoid biosynthetic pathway in *Escherichia coli* for production of the anti-malarial drug precursor amorpha-4, 11-diene. *Metab Eng*, 2009, 11(1): 13-19.
- [16] Huang QL, Roessner CA, Croteau R, et al. Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol. *Bioorg Med Chem*, 2001, 9(9): 2237-2242.

- [17] Yang JM, Guo LZ. Biosynthesis of β -carotene in engineered *E. coli* using the MEP and MVA pathways. *Microb Cell Fact*, 2014, 13(1): 160.
- [18] 金应福, 韩莉, 张莎莎, 等. 通过番茄红素环化酶的优化构建 β -胡萝卜素高产菌株. *生物工程学报*, 2017, 33(11): 1814-1826.
- Jin YF, Han L, Zhang SS, et al. Construction of high-yield strain by optimizing lycopene cyclase for β -carotene production. *Chin J Biotech*, 2017, 33(11): 1814-1826 (in Chinese).
- [19] Yoon SH, Lee SH, Das A, et al. Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of β -carotene in *E. coli*. *J Biotechnol*, 2009, 140(3-4): 218-226.
- [20] Ghimire GP, Lee HC, Sohng JK. Improved squalene production via modulation of the methylerythritol 4-phosphate pathway and heterologous expression of genes from *Streptomyces peucetius* ATCC 27952 in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(22): 7291-7293.
- [21] Katabami A, Li L, Iwasaki M, et al. Production of squalene by squalene synthases and their truncated mutants in *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng*, 2015, 119(2): 165-171.
- [22] Xu W, Yao J, Liu LJ, et al. Improving squalene production by enhancing the NADPH/NADP⁺ ratio, modifying the isoprenoid-feeding module and blocking the menaquinone pathway in *Escherichia coli*. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 68.
- [23] Meng YH, Shao XX, Wang Y, et al. Extension of cell membrane boosting squalene production in the engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2020, 117(11): 3499-3507.
- [24] Yang LY, Wang CL, Zhou J, et al. Combinatorial engineering of hybrid mevalonate pathways in *Escherichia coli* for protoilludene production. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 14.
- [25] Landl KM, Klösch B, Turnowsky F. ERG1, encoding squalene epoxidase, is located on the right arm of chromosome VII of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1996, 12(6): 609-613.
- [26] Kim IK, Yim HS, Kim DW, et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a *ytfG* gene product from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004, 60(pt 2): 365-367.
- [27] Adams MA, Iannuzzi P, Jia Z. MdaB from *Escherichia coli*: cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2005, 61(pt 2): 235-238.
- [28] Campbell ZT, Baldwin TO. Fre is the major flavin reductase supporting bioluminescence from *Vibrio harveyi* luciferase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2009, 284(13): 8322-8328.
- [29] Bamford VA, Armour M, Mitchell SA, et al. Preliminary X-ray diffraction analysis of YqjH from *Escherichia coli*: a putative cytoplasmic ferri-siderophore reductase. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2008, 64(pt 9): 792-796.
- [30] Driggers CM, Dayal PV, Ellis HR, et al. Crystal structure of *Escherichia coli* SsuE: defining a general catalytic cycle for FMN reductases of the flavodoxin-like superfamily. *Biochemistry*, 2014, 53(21): 3509-3519.
- [31] Andrade SL, Patridge EV, Ferry JG, et al. Crystal structure of the NADH: quinone oxidoreductase WrbA from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2007, 189(24): 9101-9107.
- [32] Sakakibara J, Watanabe R, Kanai Y, et al. Molecular cloning and expression of rat squalene epoxidase. *J Biol Chem*, 1995, 270(1): 17-20.
- [33] Nakano C, Motegi A, Sato T, et al. Sterol biosynthesis by a prokaryote: first *in vitro* identification of the genes encoding squalene epoxidase and lanosterol synthase from *Methylococcus capsulatus*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(10): 2543-2550.
- [34] Nagumo A, Kamei T, Sakakibara J, et al. Purification and characterization of recombinant squalene epoxidase. *J Lipid Res*, 1995, 36(7): 1489-1497.
- [35] Dinkova-Kostova AT, Talalay P. NAD(P)H: quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch Biochem Biophys*, 2010, 501(1): 116-123.
- [36] Friedrich T, Dekovic DK, Burschel S. Assembly of the *Escherichia coli* NADH: ubiquinone oxidoreductase (respiratory complex I). *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1857(3): 214-223.
- [37] Li DS, Zhang Q, Zhou ZJ, et al. Heterologous biosynthesis of triterpenoid dammarenediol- II in engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(4): 603-609.
- [38] Arnesen JA, Kildegaard KR, Cernuda Pastor M, et al. *Yarrowia lipolytica* strains engineered for the production of terpenoids. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 945.

(本文责编 陈宏宇)