



地中海富盐菌 PhaE 蛋白乙酰化修饰对其功能的影响

姜雄健^{1,2}, 王前¹, 刘桂明¹, 赵大贺¹, 刘景芳^{1*}, 向华^{1,2*}

¹中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

²中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049

摘要:【目的】研究地中海富盐菌 PHA 合酶(PhaEC)中 PhaE 亚基乙酰化修饰对其功能的影响, 探讨乙酰化修饰对菌体生理代谢的调控作用。【方法】蔗糖密度梯度离心收集 PHA 颗粒, 质谱鉴定颗粒结合蛋白 PhaE 的乙酰化位点。将乙酰化位点(赖氨酸, K)分别突变为精氨酸(R)(模拟去乙酰化)或谷氨酰胺(Q)(模拟乙酰化), 利用同源双交换原理, 将突变后的基因原位敲入基因组。以野生型为对照, 检测突变对菌体生长、葡萄糖消耗和 PHA 合成能力的影响。利用 Western blot 检测 PHA 颗粒上 PhaE 的含量, 进一步分析乙酰化修饰对蛋白功能的影响。【结果】在 PhaE 蛋白 105 位和 170 位赖氨酸(K) 2 个位点检测到乙酰化修饰。利用遗传操作系统将突变的基因原位敲入, 共得到 6 种突变株。发酵结果表明, 任何一种单突变对菌体生长及 PHA 合成的影响均不明显。但当 2 个位点同时突变成精氨酸(K105R/K170R)时, 突变株生长及合成 PHA 的能力均受到明显抑制, 2 个位点同时突变成谷氨酰胺(K105Q/K170Q)则无明显影响。进一步的 Western blot 结果表明, 突变成精氨酸的双突变株的 PHA 颗粒上, PhaE 蛋白的含量相较于野生型约降低了一半。【结论】PhaE 蛋白的去乙酰化能够导致菌株利用葡萄糖合成 PHA 的能力显著降低, 其可能原因是降低了 PhaE 与 PHA 颗粒或 PHA 颗粒上 PhaC 的结合能力, 从而降低了 PhaEC 合酶的活性。

关键词: 乙酰化, PHA 合酶, PhaE, 突变, 嗜盐古菌

蛋白质翻译后修饰, 是指 mRNA 被翻译成蛋白质后, 蛋白质上个别氨基酸残基被共价修饰的过程。它使蛋白质的结构更为复杂, 功能更为完善, 调节更为精细, 作用更为专一^[1]。迄今为止, 已有 400 多种蛋白质翻译后修饰被发现([http://](http://www.uniprot.org/docs/ptmlist)

www.uniprot.org/docs/ptmlist), 随着技术进步, 越来越多的修饰种类被发现。其中研究较多的包括磷酸化、甲基化、泛素化、糖基化、乙酰化、琥珀酰化、亚硝基化等。早在 20 世纪 60 年代, 真核生物组蛋白 N 末端赖氨酸乙酰化现象已被发现^[2]。

基金项目: 国家自然科学基金(31330001); 食品科学与工程浙江省重中之重一级学科开放基金(YTsp20142014)

*通信作者。刘景芳, Tel: +86-10-64807475, E-mail: liujf@im.ac.cn; 向华, Tel/Fax: +86-10-64807472, E-mail: xiangh@im.ac.cn

收稿日期: 2017-01-23; 修回日期: 2017-03-01; 网络出版日期: 2017-03-29

但直到 21 世纪初, 这种修饰才引起人们的广泛关注。乙酰化主要发生在赖氨酸残基上, 根据修饰位点的不同, 赖氨酸乙酰化主要分成两类, 一类是 N 末端乙酰化, 乙酰基团位于赖氨酸 α 位碳原子的氨基上; 另一类是内部赖氨酸乙酰化, 乙酰基团位于内部赖氨酸 ϵ 位碳原子的氨基上。前者是一种不可逆修饰, 与蛋白质的稳定性密切相关; 后者是一种可逆修饰, 在调节蛋白的结构和功能方面发挥重要作用^[3]。

已有的乙酰化修饰组学研究表明, 乙酰化修饰在真核和原核生物中均广泛存在, 且在细胞的生命活动中发挥着重要的作用。在真核生物中, 组蛋白的乙酰化能够促进 DNA 与组蛋白八聚体的解离, 从而促进基因的转录与翻译过程^[4]。在稳定期的大肠杆菌中, 复制起始蛋白 DnaA 的乙酰化能够阻止其与 ATP 或者 *oriC* 的结合, 抑制 DNA 的复制起始, 调节复制起始的频率^[5]。已有的研究表明, 乙酰化修饰不仅参与 DNA 复制起始和基因转录的调控, 在代谢过程中也发挥着重要的调控作用。在沙门氏菌中, 人们发现, 在不同的碳源中, 乙酰化修饰通过调节中心代谢途径中代谢酶乙酰化水平的变化, 调节细胞碳代谢流的方向^[6]。相较于真核生物和细菌, 人们对乙酰化修饰在古菌中的作用却知之甚少。

地中海富盐菌(*Haloflex mediterranei*)是一株分离自西班牙海水晒盐场的极端嗜盐古菌, 它能够利用多种碳源合成生物可降解塑料 PHA (Polyhydroxyalkanoate, 聚羟基脂肪酸酯)。PHA 是一种生物聚酯, 主要作为胞内碳源、能源及还原力的贮藏性物质, 在胞内以颗粒形式存在^[7]。在 PHA 颗粒上结合着很多与 PHA 代谢相关的蛋白, 本实验室前期研究表明, 地中海富盐菌 PHA 颗粒共结合 5 种蛋白, 它们的编码基因组成了 *pha* 基

因簇(*phaJ-phaR-phaP-phaE-phaC*)。其中, PhaP 是 PHA 颗粒的主要结构蛋白, PhaR 是调控蛋白, 它们的基因有 8 bp 的重叠且 *phaP* 与 *phaR* 共转录^[8-9]; PhaJ 是与 PHA 降解相关的蛋白^[10]; PhaEC 是 PHA 合成过程中关键的合酶, 其中 PhaC 是合酶的大亚基, 具有活性催化中心; PhaE 则为小亚基, 是该合酶不可或缺的组分, 一般被认为可调节活性, 但其调节机制尚不清楚^[11]。

本研究利用高分辨率质谱对地中海富盐菌 PHA 颗粒结合蛋白的乙酰化修饰进行了鉴定, 发现 PHA 合酶 PhaEC 的小亚基 PhaE 具有乙酰化现象, 通过对其乙酰化位点的突变研究, 初步探讨了 PhaE 乙酰化修饰对菌体生长、葡萄糖消耗以及 PHA 合成能力的影响, 为深入研究乙酰化修饰调控 PHA 代谢的分子机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 引物设计合成及测序: 根据 GenBank 登录的地中海富盐菌基因组序列, 利用 Primer 引物设计软件设计特异性引物(表 1), 由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。所构建突变敲除载体的测序由睿博兴科生物技术(北京)有限公司完成。

1.1.2 质粒与菌株: 本实验所用质粒和菌株如表 2 和表 3 所示, 大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109、110, 地中海富盐菌(*Haloflex mediterranei*)野生型、部分敲除株, 以及敲除质粒 pHFX (Amp^r)均由本实验室保存。其他 *phaE* 突变敲入载体及 *phaE* 突变株均为本研究中构建。

1.1.3 酶和试剂: 用于 PCR 扩增的 Taq DNA 聚合酶购自生工生物工程(上海)股份有限公司, KOD plus 高保真聚合酶购自 TOYOBO 公司(上海); DNA 限制

表 1. 引物序列

Table 1. The primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')
phaEC-DF3	CAGGTCGACTCTAGAGCGATGGGTGACTTCC
phaEC-DR3	AACCAGTACCGGTAAGGATAGCACAGCGAAA
phaEC-K105R-F1	GCGAACGAGGCATTCCGCGAGGTGATGGGTACC
phaEC-K105R-R1	GGTACCCATCACCTCGCGGAATGCCTCGTTTCGC
phaEC-K105Q-F1	GCGAACGAGGCATTCCAGGAGGTGATGGGTACC
phaEC-K105Q-R1	GGTACCCATCACCTCCTGGAATGCCTCGTTTCGC
phaEC-K170R-F1	CACGCCGTCGAGACGCGCCTCGACCGGCTCCTC
phaEC-K170R-R1	GAGGAGCCGGTCGAGGCGCGTCTCGACGGCGTG
phaEC-K170Q-F1	CACGCCGTCGAGACGCGCCTCGACCGGCTCCTC
phaEC-K170Q-R1	GAGGAGCCGGTCGAGGCGCGTCTCGACGGCGTG
phaEC-VF2	ACGCAGTTCTCCAGTTACA
phaEC-VR2	CGTTGTGAATGTACCCGAAG

表 2. 本文中使用的质粒

Table 2. The plasmids used in this study

Plasmid	Characteristics	Source or reference
pHFX	4.0 kb, integration vector containing <i>pyrF</i> and its native promoter, Amp ^r	Liu, et al. 2011 ^[12]
pDEC	5.3 kb, integration vector of pHFX for knock-out of <i>phaEC</i>	Cai, et al. 2014 ^[9]
pHFX- <i>phaEC</i>	7.3 kb, integration vector of pHFX for cloning with <i>phaC</i> and <i>phaE</i>	This study
pK105R	7.3 kb, pHFX- <i>phaEC</i> derived integration vector for knock-in of <i>phaC</i> and <i>phaE</i> (with the K105R mutation) into DFS-01 to generate E (K105R)	This study
pK105Q	7.3 kb, pHFX- <i>phaEC</i> derived integration vector for knock-in of <i>phaC</i> and <i>phaE</i> (with the K105Q mutation) into DFS-01 to generate E (K105Q)	This study
pK170R	7.3 kb, pHFX- <i>phaEC</i> derived integration vector for knock-in of <i>phaC</i> and <i>phaE</i> (with the K170R mutation) into DFS-01 to generate E (K170R)	This study
pK170Q	7.3 kb, pHFX- <i>phaEC</i> derived integration vector for knock-in of <i>phaC</i> and <i>phaE</i> (with the K170Q mutation) into DFS-01 to generate E (K170Q)	This study
pK105/170R	7.3 kb, pHFX- <i>phaEC</i> derived integration vector for knock-in of <i>phaC</i> and <i>phaE</i> (with the K105R/K170R mutation) into DFS-01 to generate E (K105/170R)	This study
pK105/170Q	7.3 kb, pHFX- <i>phaEC</i> derived integration vector for knock-in of <i>phaC</i> and <i>phaE</i> (with the K105Q/K170Q mutation) into DFS-01 to generate E (K105/170Q)	This study
pTA03-5220	8.5 kb, expression vector of PhaE	This study

表 3. 本文中使用的菌株

Table 3. The strains used in this study

Strain	Characteristics	Source or reference
<i>E. coli</i> JM109	Host for plasmid construction	Invitrogen
<i>E. coli</i> JM110	Host for plasmid construction	Invitrogen
<i>Haloflex mediterranei</i>	Wild-type strain=ATCC 33500	CGMCC
<i>H. mediterranei</i> DF50	<i>pyrF</i> -deleted mutant of <i>H. mediterranei</i>	Liu, et al. 2011 ^[12]
EPS	<i>eps</i> -deleted mutant of <i>H. mediterranei</i> DF50	Liu, et al. 2015 ^[10]
DFS-01	<i>phaE</i> -deleted and <i>phaC</i> -deleted mutant of EPS	This study
E (K105R)	EPS strain with PhaE carrying a K105R mutation	This study
E (K105Q)	EPS strain with PhaE carrying a K105Q mutation	This study
E (K170R)	EPS strain with PhaE carrying a K170R mutation	This study
E (K170Q)	EPS strain with PhaE carrying a K170Q mutation	This study
E (K105/170R)	EPS strain with PhaE carrying a K105R/K170R mutation	This study
E (K105/170Q)	EPS strain with PhaE carrying a K105Q/K170Q mutation	This study
<i>Haloflex volcanii</i> H1424	<i>Haloflex</i> host strain for protein expression	Stroud, et al. 2012 ^[13]

性内切酶、T4 DNA 连接酶、T4 DNA 聚合酶购自 New England Biolabs 公司; DNA marker (100 bp 和 1 kb)购自博迈德科技(北京)发展有限公司; 质粒提取和 DNA 凝胶 PCR 产物回收试剂盒购自 Axygen 公司。

HisTrap HP 1 mL 镍柱购自 GE 公司; 超滤离心管(10 kDa)购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 2-D 蛋白定量试剂盒购自 GE 公司, 预染蛋白 marker 购自 Thermo 公司; 碘乙酰胺购自 GE 公司; 胰酶 trypsin 购自 Roche 公司。

1.1.4 培养基和溶液: 嗜盐古菌常用培养基 AS-168; 特殊培养基 YE 培养基(AS-168 不加 Yeast extract); PA 培养基(g/L): NaCl 110.00, MgSO₄·7H₂O 29.52, MgCl₂·6H₂O 20.51, KCl 5.00, CaCl₂ 1.00, NH₄Cl 2.00, 微量元素溶液 SL-6^[14] 1 mL, 柠檬酸铁铵 8 mg, 1,4-piperazinediethanesulfonic acid (PIPES) 15.00, Glucose 10.00, pH 值为 7.2; YPC 培养基(g/L): NaCl 144.00, MgCl₂·6H₂O 30.00, MgSO₄·7H₂O 33.00, KCl 4.20, CaCl₂ 0.33, Yeast extract 5.00, Peptone (soya) 1.00, Casamino acids 5.00, 1 mol/L Tris-Cl (pH 7.5) 12 mL, pH 值为 7.5。蛋白纯化缓冲液 A、B; 以及 PHA 酯化液等按相关文献配制^[10]。

1.2 菌体的培养

将 DF50 在 AS-168 平板上划线培养后, 挑取单克隆至 10 mL AS-168 液体培养基中培养, 待培养 2–3 d 至稳定前期后以 1:25 的比例转移至 150 mL PA 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 18 h 后收集菌体^[15]。

1.3 PHA 颗粒的提取

采用蔗糖密度梯度离心法提取 PHA 颗粒^[16]。收集生长至稳定期的菌体, 用 TBSL (g/L, NaCl 150, KCl 20, MgSO₄·7H₂O 5, Tris-Cl 100 mmol/L)

冲洗 2 次后加入适量 TBSL 溶液重悬菌体, 然后超声破碎菌体(250 W, 3 s on/5 s off, 30 min)。破碎后的菌液加入超离管中, 依次在底部缓慢注入浓度为 1.0、1.3、1.6 mol/L 的蔗糖溶液(采用 100 mmol/L pH 7.1 的 Tris-Cl 缓冲溶液配制)。31000 r/min 离心 2.5 h 后取出位于 1.3 mol/L 和 1.6 mol/L 蔗糖梯度之间的 PHA 颗粒层。

1.4 颗粒蛋白的分离

将利用蔗糖密度梯度离心纯化的 PHA 颗粒, 重悬于溶解缓冲液(6 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲), 于 4 °C 摇匀过夜, 使蛋白充分溶解于缓冲液中。经 11000 r/min 离心 10 min, 转移上清至新 EP 管中并多次重复离心, 以尽量除去不溶物。

1.5 PhaE 蛋白乙酰化位点鉴定

将洗脱的颗粒蛋白用 10 K Nano Sep 离心柱 (Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA)离心浓缩, 用 2-D 蛋白定量试剂盒进行定量。取 300 µg 颗粒蛋白利用 10 K Nano Sep 离心柱, 13000 g 离心脱盐, 在该离心柱超滤膜[Ultra filtration (UF)]上 37 °C 酶解过夜, 酶量按 50 : 1 (蛋白:酶)的比例添加, 胰酶溶于 20 mmol/L 三乙基铵碳酸氢钠(Triethylammonium bicarbonate, TEAB)中。按 100 : 1 补加酶继续酶解 3–4 h。离心收集酶解肽段。分别用 50 µL 50 mmol/L TEAB 和 20 mmol/L TEAB 洗涤滤膜 2 次, 将 3 次离心所得酶解肽段合并, SpeedVac 真空干燥。将样品溶于 0.1%的甲酸(Formic acid)后于 C₁₈ 柱子(75 µm ID × 150 mm, 2 µm, 100 Å)进行分离, 随后利用 Thermo Orbitrap Fusion mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)进行 MS 和 MS/MS 分析[参数: MS 分辨率 (@ *m/z* 200) 120000; 扫描范围(*m/z*) 350–1550; 最大注射速率 (ms) 50 ; AGC Target 2.00E+05 。 MS/MS :

Fragmentation HCD: NCE (%) 35; Detector Type: Ion Orbitrap; AGC Target 1.00E+04; Max Injection (ms) 100; Dynamic Exclusion (sec) 60]。所得质谱数据利用 Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.5) 软件对地中海富盐菌 Uniprot 蛋白质组数据库进行搜索, 搜库参数: 碎片离子分子量容忍度 0.020 Da; 母离子容忍度 15.0 PPM。赖氨酸乙酰化、甲硫氨酸氧化、谷氨酰胺和天冬酰胺脱酰胺设定为可变修饰, 肽段得分值设定为 30。

1.6 PhaE 蛋白乙酰化位点突变株的构建

在 pHFX-*phaEC* 野生型敲入载体的基础上, 设计突变引物(表 1)环式 PCR 扩增整个质粒。PCR 产物经 *Dpn* I 酶消化后转化大肠杆菌 JM109, 挑取单克隆提取质粒后进行测序验证, 验证成功后的突变型质粒转化大肠杆菌 JM110, 挑取阳性克隆培养后提取质粒(去甲基化, 提高转化效率), 然后将质粒转化 DFS-01 菌株, 利用同源交换原理^[12], 首先通过同源臂(上游或下游)将整个质粒敲入基因组中, 利用 YE 培养基(尿嘧啶营养缺陷型筛选压力)筛选单交换菌株。将筛选得到的单交换菌株单克隆接入双交换筛选培养基即含尿嘧啶(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及 5-氟乳清酸(5-Fluoroorotic acid, FOA, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 AS-168 中, 在反向筛选压力下同源臂(下游或上游)进行第 2 次交换, 用验证引物(表 1)筛选双交换阳性克隆, 得到 PhaE 乙酰化位点原位突变的目的菌株(表 3)。

1.7 PhaE 蛋白突变株的生长测定

挑取实验菌株单克隆至 10 mL AS-168 液体培养基中培养, 2–3 d 后以 1:25 的比例转移至 150 mL PA 发酵培养基中, 在第 0、12、24、36、48、72、96、120 h 取 1 mL 菌液测定其 OD_{600} 值。取生长至 72 h 的菌体, 测定其 OD_{600} 值, 将野生

型和突变株稀释至相同的 OD_{600} 值后, 对菌液进行连续梯度稀释, 每个梯度取 6 μL 点在固体 PA 培养平板上, 拍照监测菌体的生长变化。

1.8 PhaE 蛋白突变株的 PHA 产量检测

利用将 PHA 甲酯化的方法分析细胞积累 PHA 的含量及组分^[10]。步骤如下: 收集菌体, $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 冻存 3–4 h, 迅速转移进行冷冻真空干燥, 称取约 80 mg 左右的样品于酯化管中, 加入 2 mL 酯化液(970 mL 甲醇, 30 mL 浓硫酸, 1 g 苯甲酸)和 2 mL 氯仿, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱处理 4 h。冷却至室温后, 加入 1 mL ddH₂O, 振荡混匀后静置分层。取 1 μL 氯仿相进行气相色谱分析(GC-6820, Agilent)。PHBV 标样购自 Sigma 公司。

1.9 PhaE 蛋白突变株的葡萄糖消耗情况检测

在上述培养过程中, 在 24、48、72、96、120 h 取样, 于 12000 r/min 离心 5 min 后, 取上清用 ddH₂O 稀释 20 倍。然后取 25 μL 稀释液进行葡萄糖浓度测定(SBA-40D 型生物传感分析仪, 山东省生物传感器重点实验室), 1 g/L 葡萄糖作为标样使用。

1.10 PhaE 蛋白的异源表达与纯化

将带有 6*His Tag 的 PhaE 蛋白表达载体 PTA03-5220 转入表达宿主 *Haloferax volcanii* H1424^[13]中。转化成功后在 $42\text{ }^\circ\text{C}$ 、200 r/min 的条件下在 YPC 液体培养基中培养至稳定期收集菌体。用适量裂解缓冲液重悬菌体, 超声破碎(3 s on/5 s off, 200 W, 30 min), 离心取上清, 0.22 μm 膜过滤。采用镍重力柱对目的蛋白进行挂柱回收, 10 倍体积清洗缓冲液(咪唑浓度 20 mmol/L)清洗柱子, 适量洗脱缓冲液(咪唑浓度 1 mol/L)洗脱蛋白。将样品经 SDS-PAGE 分离后利用质谱鉴定目的蛋白^[10]。

1.11 Western blot

我们利用 Western blot 方法对颗粒蛋白上的

PhaP 与 PhaE 蛋白进行相对定量。PhaP、PhaE 抗体均由遗传与发育研究所实验动物中心制作。取适量的 PHA 颗粒样品水浴煮沸，离心后取上清经 SDS-PAGE 分离后进行 Western blot 检测^[15]。运用 ImageJ 软件对显影条带进行定量计算，以 PhaP 蛋白含量作为内参，对 PhaE 蛋白的含量进行相对定量。

2 结果和分析

2.1 PHA 颗粒蛋白的分离及 PhaE 乙酰化位点的鉴定

PHA 颗粒蛋白经蔗糖密度梯度离心后，如图 1-A 所示，在 1.3 mol/L 和 1.6 mol/L 浓度蔗糖溶液之间存在一个明显的白色颗粒层，即为 PHA 颗粒。将其收集后经 6 mol/L 尿素和 2 mol/L 硫脲洗脱收集颗粒蛋白。该蛋白混合物的酶解肽段经 Nano-LC-MS/MS 分析和 Mascot 搜库后，我们在 PhaE 蛋白上共鉴定到 2 个高度可信的乙酰化肽段，分别是 DIWLNSANEAFK_[Ac]EVMGTSFAAAATGQTVEDALEMQR 和 RQHAVETK_[Ac]LDR。前一个肽段上的乙酰化位点为 105 位的赖氨酸(K_[Ac])，后一个肽段上的乙酰化位点为 170 位赖氨酸(K_[Ac])。图 1-B 所示即为乙酰化肽段 RQHAVETK_[Ac]LDR

的 MS/MS 鉴定图谱(含 K170 乙酰化位点)。

2.2 phaE 基因突变株的构建

为了检测 PHA 合酶 PhaEC 中 PhaE 亚基 K105 及 K170 位点乙酰化修饰对该菌生理代谢的影响，我们对上述 2 个位点分别进行了单突变和双突变。利用表 1 中的突变引物，以野生型的 pHFX-phaEC 质粒为模板，采用环式 PCR 的方法扩增，PCR 产物经 Dpn I 消化转化大肠杆菌 JM109，挑取转化子提取质粒进行测序验证，突变成功的转化子约占 1/5，双突变型质粒在单突变型质粒基础上构建。得到质粒后，将质粒转化大肠杆菌 JM110，得到阳性克隆后再提取质粒转化地中海富盐菌 DFS-01，对转化子进行单、双交换筛选，用检测引物 phaEC-VF2、phaEC-VR2 (表 1)进行验证，共得到 6 种 PhaE 突变株。其中，E (K105R)、E (K170R)、E (K105/170R) (表 3) 3 个突变株将乙酰化的赖氨酸突变为精氨酸，模拟去乙酰化状态；E (K105Q)、E (K170Q)、E (K105/170Q) (表 3) 3 个突变株将乙酰化的赖氨酸突变为谷氨酰胺，模拟乙酰化状态。用上述分别模拟去乙酰化和乙酰化状态的突变株，在后续的研究中，检测乙酰化修饰对菌体生理代谢的影响。

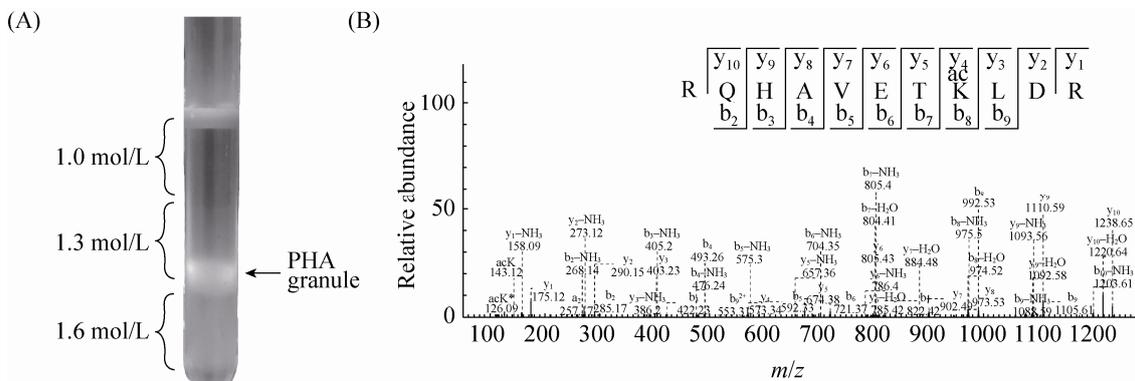


图 1. 蔗糖密度梯度离心收集 PHA 颗粒和 PhaE 乙酰化肽段 MS/MS 鉴定图谱

Figure 1. MS/MS analysis of the acetylated peptide of the PHA-granule protein PhaE. A: PHA granules collected by sucrose density gradient centrifugation; B: MS/MS spectra of the acetylated peptide RQHAVETK_[Ac]LDR of the PhaE.

2.3 PhaE 乙酰化位点突变影响菌体的生理代谢

2.3.1 PhaE 乙酰化位点突变抑制菌体的生长:

PhaE 是 PHA 合成途径中的关键酶, 它的突变可能会引起 PHA 合成情况的改变, 而 PHA 又与细胞的物质和能量代谢密切相关, 因此推测突变可能会影响菌体的生长和 PHA 的合成。本研究采用发酵培养基 PA 培养实验菌株, 首先通过测定发酵液 OD_{600} 的值来反映菌体的生长和 PHA 的合成情况。

实验结果表明, K105 和 K170 两个乙酰化位点的任何一种单点突变都不能对菌体 OD_{600} 值造成明显影响(数据未展示), 但将 2 个乙酰化的赖氨酸都突变成精氨酸时, 如图 2-A 所示, 与野生型相比, 从 48 h 开始, 精氨酸双突变菌株 E (K105/170R) OD_{600} 值增加明显减慢, 在 96 h 时, E (K105/170R) 突变株 OD_{600} 值不足 6, 野生型 OD_{600} 值已大于 10。而谷氨酰胺双突变株 E (K105/170Q) OD_{600} 值自 24 h 之后, 已表现出显著的增加, 且较野生型略高。说明 PhaE 去乙酰化显著抑制了菌体 OD_{600} 值的增加。

为了进一步验证双突变菌株是否影响菌体的生长, 我们利用梯度稀释平板法检测了不同突变

株的生长情况。如图 2-B 所示, 在固体培养基(PA)平板上, 相同起始数量的菌株细胞(均约 10^7), 从稀释度 10^{-4} 开始可以看出 E (K105/170R) 双突变株的生长慢于野生型和谷氨酰胺双突变株 E (K105/170Q), 特别是在稀释度 10^{-5} 中, 精氨酸双突变株 E (K105/170R) 的生长明显慢于野生型和谷氨酰胺双突变株 E (K105/170Q)。说明 PhaE 去乙酰化确实抑制了菌体的生长。

2.3.2 PhaE 乙酰化位点突变影响 PHA 的合成:

由于菌体中 PHA 颗粒积累情况也会影响 OD_{600} 值, 我们推测精氨酸双突变株 OD_{600} 值增加减缓(图 2-A)可能也与 PHA 合成有关, 且 PhaE 是 PHA 合成的关键酶, 因此我们进一步分析了突变株在培养过程中 PHA 含量的变化, 以了解菌体中 PHA 的积累是否也是 OD_{600} 值增加明显减缓的重要原因。

如图 3 所示, 在发酵培养基 PA 中, 与 OD_{600} 值的变化趋势类似, 48 h 后, 突变株 E (K105/170R) PHA 合成能力受到明显影响, 在 72 h 时其 PHA 产量明显低于野生型菌株。96 h 时, 突变株

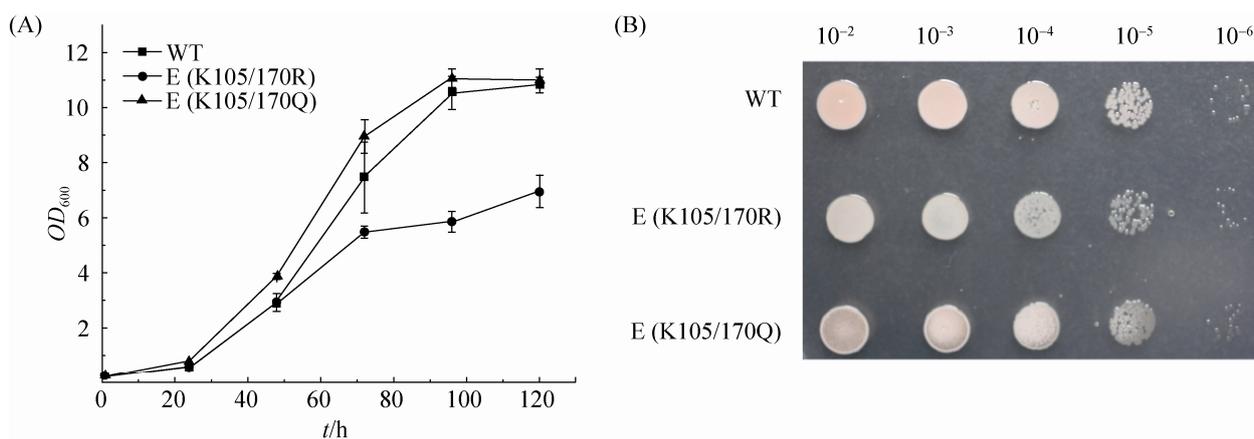


图 2. 野生型与突变型菌株生长情况测定

Figure 2. Cell growth comparison of the wild-type (strain EPS), E (K105/170R) and E (K105/170R) strains. A: the growth curves of the strains detected by OD_{600} . The value of OD_{600} of the WT is more than 1.8-fold to the E (K105/170R) strain at 96 h ($P < 0.01$, $n = 3$); B: growth detection by serial dilution spotting assay. Compared to the WT and E (K105/170Q), the growth of E (K105/170R) is a little bit slower.

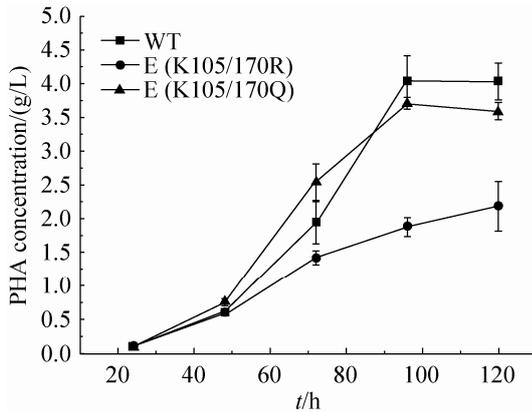


图 3. 野生型与突变型菌株产 PHA 能力测定

Figure 3. Time courses of PHA accumulation in different strains. The PHA concentration of the WT (EPS strain) is more than 2.1-fold to the E (K105/170R) strain at 96 h ($P < 0.01$, $n = 3$).

E (K105/170R)积累的 PHA 仅为 1.75 g/L, 而野生型合成的 PHA 为 4.0 g/L, 约 2.3 倍于突变株 E (K105/170R)。而谷氨酰胺双突变株 E (K105/170Q) 自 48 h 之后, 其 PHA 合成呈显著增加的趋势, 在 96 h 时也高达 3.5 g/L, 与野生型接近。由此可见, PhaE 去乙酰化直接影响了 PHA 的合成能力(图 3), 进而可能间接地影响了菌株的生长(图 2-B), 因此应是二者的叠加效应减缓了突变株 E (K105/170R) OD_{600} 值的增加(图 2-A)。

2.3.3 PhaE 乙酰化位点突变降低菌体葡萄糖消耗能力

在发酵培养基 PA 中, 葡萄糖作为唯一的碳源, 其消耗程度能够从侧面反映菌体生长及代谢的情况, 且糖酵解的中间产物乙酰辅酶 A 是 PHA 合成的重要前体物质, 因此通过检测菌体葡萄糖的消耗能力, 不仅可以判断乙酰化修饰与菌体生长的相关性, 也可进一步验证其对 PHA 合成的影响。由图 4 可以看出, 自 48 h 开始, 突变菌株 E (K105/170R) 的葡萄糖利用速率明显低于野生型及另外一个突变株 E (K105/170Q)。96 h 时, 野生型和谷氨酰胺双突变株 E (K105/170Q) 发酵液

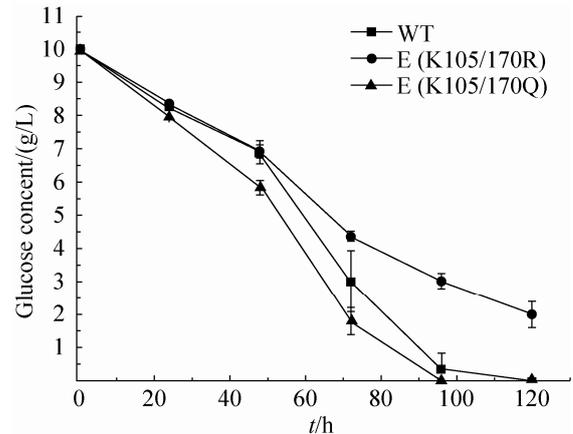


图 4. 野生型与突变型菌株发酵液葡萄糖含量测定

Figure 4. Time courses of glucose consumption during 120-h fermentation. The WT (strain EPS) had almost used up the glucose while the E (K105/170R) still had about 3 g/L of glucose in the medium at 96 h ($n = 3$).

中葡萄糖含量已趋近于 0, 而突变株 E (K105/170R) 发酵液中葡萄糖含量仍有 3 g/L, 其发酵液中葡萄糖完全消耗殆尽, 则需要 7 d 时间(数据未展示)。显然, 突变株 E (K105/170R) 葡萄糖消耗速率远远低于野生型和谷氨酰胺双突变株。该结果进一步证明, PhaE 去乙酰化影响了 PHA 合成, 导致菌体生长减慢, 同时其葡萄糖利用速度明显降低。

2.4 PhaE 乙酰化位点突变影响 PHA 颗粒上 PhaE 含量

上述结果表明, PhaE 去乙酰化影响了菌体对葡萄糖的利用以及 PHA 的合成, 而 PhaE 是 PHA 合成中的关键酶, 我们推测, 正是因为 PhaE 乙酰化位点的突变, 影响了 PHA 合酶 PhaEC 的活性, 导致葡萄糖的代谢中间产物不能很好地转化为碳源贮藏物质 PHA, 从而减缓了葡萄糖的消耗速率。已有的研究表明, PhaEC 合酶通过结合在 PHA 颗粒上发挥其 PHA 合成活性^[11]。因此我们分别检测了野生型与突变株 PHA 颗粒上 PhaE 蛋白含量的变化。分别将野生型与突变株 E (K105/170R) 进行

发酵培养, 在 48 h 收集其 PHA 颗粒, 取等量的 PHA 颗粒, 利用 Western blot 分别检测 PHA 结构蛋白 PhaP 和 PHA 合成关键蛋白 PhaE 在 PHA 颗粒中的含量。如图 5 所示(野生型和突变株均为 2 个泳道重复), 在野生型和突变株中, 在结构蛋白 PhaP 含量相当的情况下, 突变株 PHA 颗粒上的 PhaE 蛋白显著降低, 约为野生型 PHA 颗粒上所结合 PhaE 的 58%。已有研究表明, 赖氨酸的乙酰化修饰可中和赖氨酸所带的正电荷^[16], 因此我们推测去乙酰化(突变为精氨酸 R)恢复了赖氨酸带正电的特性, 从而影响了其与 PHA 颗粒的结合, 而突变成谷氨酰胺(模拟乙酰化)对菌体的生理代谢无明显影响也从反面证实了这一推测。

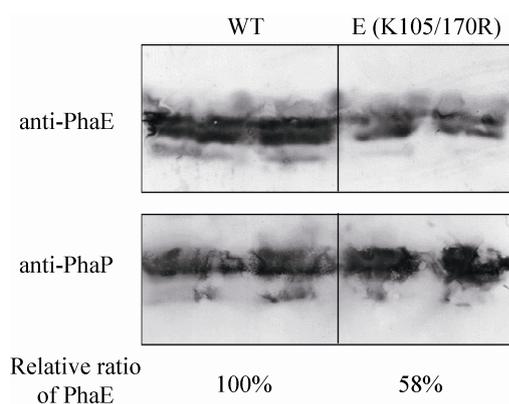


图 5. 野生型与突变型菌株 PhaE 与颗粒结合 Western blot 分析

Figure 5. Analysis of PhaE abundance on PHA granules by Western blot. WT: The EPS strain.

3 讨论

地中海富盐菌全基因组测序表明, 该菌中共有 11 个乙酰化酶基因和 2 个去乙酰化酶基因^[17], 远高于大多数原核生物中乙酰化酶和去乙酰化酶的数目, 暗示乙酰化修饰在该菌中具有重要的生理功能。如前所述, PHA 是在碳源过量的条件下,

由菌体合成的一种作为胞内碳源、能源及还原力的贮藏性物质。地中海富盐菌可以从乙酰辅酶 A 和丙酰辅酶 A 前体物质出发, 特异地积累聚羟基丁酸-羟基戊酸共聚酯[poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), PHBV]^[17]。乙酰化修饰也是以乙酰辅酶 A 为乙酰基供体, 在乙酰化酶的催化下完成对底物的修饰^[3]。众所周知, 乙酰辅酶 A 是生物体内重要的物质和能量代谢的中间产物, 在地中海富盐菌中, 乙酰辅酶 A 既是 PHA 合成的前体物质, 又是乙酰化修饰的乙酰基供体, 因此, 我们推测乙酰化修饰参与了 PHA 合成的调控。PhaEC 合酶是 PHA 合成过程中的关键酶, PhaE 是该合酶不可或缺的非催化亚基, 推测 PhaE 对该合酶活性具有重要的调节作用, 其赖氨酸位点的乙酰化修饰对该菌 PHA 合成的影响佐证了这一推测。

在沙门氏菌中, 人们发现当以葡萄糖为唯一碳源时, 中心代谢途径中的很多酶乙酰化水平显著提高, 在葡萄糖浓度相同的情况下, 敲除去乙酰化酶的突变株(乙酰化水平较野生型高)表现出更快的生长速度^[6]。说明乙酰化修饰提高了中心代谢相关酶类的活性, 促进了菌体利用葡萄糖的能力, 从而加快了菌体的生长。在本研究中, PhaE 两个乙酰化位点突变之后, 菌体也表现出葡萄糖消耗能力降低、生长变慢、PHA 合成能力下降的现象。该结果表明, 当胞内碳源过剩(如乙酰-CoA 含量高)时, PhaE 的乙酰化修饰提高了 PhaEC 合酶的 PHA 合成活性, 从而加速了菌体利用葡萄糖将过多碳源(如乙酰-CoA)转化为 PHA 的贮存过程, 反之, 去乙酰化则抑制了 PHA 的合成。

本研究 Western blot 结果表明, 在等量的 PHA 颗粒上, 乙酰化位点突变株 E (K105/170R) PHA 颗粒上 PhaE 蛋白的含量显著降低, 仅为野生型结

合 PhaE 的 58% (图 5)。由于 PhaEC 合酶是通过结合在 PHA 颗粒上发挥活性, 因此, 我们推测 PhaE 蛋白的去乙酰化改变了其带电性, 影响了 PhaEC 合酶与 PHA 颗粒或 PhaC 的结合, 从而降低了其 PHA 合成活性, 导致 PHA 产量降低。综上, 本研究表明, PhaE 的乙酰化修饰是 PhaEC 合酶活性调节的一种分子机制。

与细菌和真核生物相比, 古菌域中乙酰化修饰的研究相对较少。本研究以嗜盐古菌中的模式菌株地中海富盐菌为研究对象, 利用高分辨率质谱首次鉴定了 PHA 合成关键酶 PhaEC 中 PhaE 亚基的乙酰化修饰, 并通过乙酰化位点突变, 发现该蛋白的乙酰化修饰可调节 PHA 的合成。本研究首次从代谢方面解析了乙酰化修饰在古菌细胞活动中可能的生理功能, 为古菌中乙酰化修饰的研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Hart GW, Ball LE. Post-translational modifications: a major focus for the future of proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, 12(12): 3443.
- [2] Phillips DMP. The presence of acetyl groups in histones. *Biochemical Journal*, 1963, 87(2): 258–263.
- [3] Hentchel KL, Escalante-Semerena JC. Acylation of biomolecules in prokaryotes: a widespread strategy for the control of biological function and metabolic stress. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2015, 79(3): 321–346.
- [4] Sterner DE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(2): 435–459.
- [5] Zhang QF, Zhou AP, Li SX, Ni JJ, Tao J, Lu J, Wan BS, Li S, Zhang J, Zhao SM, Zhao GP, Shao F, Yao YF. Reversible lysine acetylation is involved in DNA replication initiation by regulating activities of initiator DnaA in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30837.
- [6] Wang QJ, Zhang YK, Yang C, Xiong H, Lin Y, Yao J, Li H, Xie L, Zhao W, Yao YF, Ning ZB, Zeng R, Xiong Y, Guan KL, Zhao SM, Zhao GP. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. *Science*, 2010, 327(5968): 1004–1007.
- [7] Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1990, 54(4): 450–472.
- [8] Cai SF, Cai L, Liu HL, Liu XQ, Han J, Zhou J, Xiang H. Identification of the haloarchaeal phasin (PhaP) that functions in polyhydroxyalkanoate accumulation and granule formation in *Haloferax mediterranei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(6): 1946–1952.
- [9] Cai SF, Cai L, Zhao DH, Liu GM, Han J, Zhou J, Xiang H. A novel DNA-binding protein, PhaR, plays a central role in the regulation of polyhydroxyalkanoate accumulation and granule formation in the haloarchaeon *Haloferax mediterranei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(1): 373–385.
- [10] Liu GM, Hou J, Cai SF, Zhao DH, Cai L, Han J, Zhou J, Xiang H. A patatin-like protein associated with the polyhydroxyalkanoate (PHA) granules of *Haloferax mediterranei* acts as an efficient depolymerase in the degradation of native PHA. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(9): 3029–3038.
- [11] Lu QH, Han J, Zhou LG, Zhou J, Xiang H. Genetic and biochemical characterization of the poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) synthase in *Haloferax mediterranei*. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(12): 4173–4180.
- [12] Liu HL, Han J, Liu XQ, Zhou J, Xiang H. Development of *pyrF*-based gene knockout systems for genome-wide manipulation of the archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloarcula hispanica*. *Journal of Genetics and Genomics*, 2011, 38(6): 261–269.
- [13] Stroud A, Liddell S, Allers T. Genetic and biochemical identification of a novel single-stranded DNA-binding complex in *Haloferax volcanii*. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 224–238.
- [14] Zhao DH, Cai L, Wu JH, Li M, Liu HL, Han J, Zhou J, Xiang H. Improving polyhydroxyalkanoate production by knocking out the genes involved in exopolysaccharide biosynthesis in *Haloferax mediterranei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(7): 3027–3036.
- [15] Han J, Lu QH, Zhou LG, Zhou J, Xiang H. Molecular characterization of the *phaEC_{HM}* genes, required for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) in the extremely halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(19): 6058–6065.
- [16] Wieczorek R, Pries A, Steinbüchel A, Mayer F. Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(9): 2425–2435.
- [17] Han J, Hou J, Zhang F, Ai GM, Li M, Cai SF, Liu HL, Wang L, Wang ZJ, Zhang SL, Cai L, Zhao DH, Zhou J, Xiang H. Multiple propionyl coenzyme A-supplying pathways for production of the bioplastic poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Haloferax mediterranei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(9): 2922–2931.

Acetylation regulates the function of PhaE in *Haloferax mediterranei*

Xiongjian Jiang^{1,2}, Qian Wang¹, Guiming Liu¹, Dahe Zhao¹, Jingfang Liu^{1*}, Hua Xiang^{1,2*}

¹ State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

² College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Objective] The purpose of this study is to study the acetylation of PhaE, one subunit of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase (PhaEC), and its function in PHA biosynthesis in *Haloferax mediterranei*. [Methods] PHA granules were collected by sucrose density gradient centrifugation. The acetylated sites of PhaE were identified by LC-MS/MS. The acetylated lysine (K) sites were mutated to arginine (R, mimics deacetylation) or glutamine (Q, mimics acetylation), and the mutated gene was knocked into the chromosome on its original location through pop-in/pop-out method. Taking wild-type strain as control, the cell growth, ability of glucose consumption, and the PHA accumulation were detected in different mutated strains. The relative abundance of PhaE on the PHA granule was also analyzed by Western blot in wild-type and mutated strains. [Results] Two acetylated sites (K105 and K170) were identified on PhaE. Six different mutant (K105R, K170R, K105Q, K170Q, K105R/K170R and K105Q/K170Q) strains were constructed. The fermentation experiments showed that none of the single-site mutation could affect the cell growth and PHA synthesis, and no obvious effect was observed when the two sites were simultaneously mutated to Q. However, the PHA accumulation significantly decreased when these two acetylated sites were mutated to R at the same time. Interestingly, Western blotting showed that abundance of PhaE on the PHA granules almost decreased to 58% of the wild type. [Conclusion] The deacetylation of PhaE decreased the PHA synthesis from glucose metabolism, which was likely resulted from the inefficient interaction between the deacetylated PhaE and the PHA granules (or PhaC on the PHA granules), thus led to reduction of the activity of PhaEC synthase for PHA biosynthesis.

Keywords: acetylation, PHA synthase, PhaE, mutation, Haloarchaea

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31330001) and by the Food Science and Engineering-the Most Important Discipline of Zhejiang Province (YTsp20142014)

*Corresponding authors. Jingfang Liu, Tel: +86-10-64807475, E-mail: liujf@im.ac.cn; Hua Xiang, Tel/Fax: +86-10-64807472, E-mail: xiangh@im.ac.cn

Received: 23 January 2017; Revised: 1 March 2017; Published online: 29 March 2017

向华, 博士, 中国科学院微生物研究所研究员, 中国科学院大学教授。1997年于中国协和医科大学获得博士学位; 2009年获国家杰出青年科学基金; 现任微生物资源前期开发国家重点实验室主任, 中国遗传学会常务理事, 中国遗传学会微生物遗传专业委员会主任, *Journal of Genetics & Genomics* 副主编和 *Applied and Environmental Microbiology* 编委等职。致力于极端嗜盐微生物遗传和生理代谢的研究及其开发利用, 在嗜盐古菌基因组复制、PHA合成与代谢、CRISPR分子机制方面等取得系统性成果, 相关工作多次被 *Science*、*Nature*、*Cell* 等顶尖杂志引用。先后主持了国家自然科学基金委重点项目、国家杰出青年科学基金项目、重大科学计划重点支持项目、海洋863项目等重要课题, 已在 *Nature Communications*、*Nucleic Acid Research*、*ISME Journal*、*Biomaterials*、*Molecular Microbiology*、*Applied Environmental Microbiology* 等专业刊物发表科研论文100余篇, 获授权发明专利10余项。

