

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-006

从翻译后修饰角度解析人工合成途径与底盘细胞的适配性

尤迪¹, 叶邦策^{1,2}

(¹ 华东理工大学微分析与生物系统工程实验室, 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237; ² 浙江工业大学工程生物学与健康研究中心, 长三角绿色制药协同创新中心, 药学院, 杭州 浙江 310014)

摘要: 揭示工程化设计的人工合成途径与底盘细胞整体代谢网络的交互作用及适配性机制是合成生物学研究的关键共性科学问题。细胞内酰基 CoA 是微生物合成生物活性物质如聚酮、萜类及黄酮类、生物碱、生物能源及生物材料等的前体, 提高细胞内酰基 CoA 供应水平, 能够促进微生物合成产率升高; 酰基 CoA 也是蛋白质酰基化修饰的酰基基团供体, 酰基 CoA 积累导致合成代谢途径相关酶的酰基化水平提高, 抑制代谢酶催化活性及合成效率。本文从酰基 CoA 平衡及酰基化修饰的角度, 重点阐述了酰基 CoA 双重效应(酰基化供体及代谢前体)的相互影响与平衡, 随后通过红霉素、丁醇、赤松素的实例总结了翻译后修饰代谢工程在调节微生物合成途径各元件间、合成途径与底盘之间的适配性, 促进产物合成方面的实际应用。

关键词: 翻译后修饰代谢工程; 酰基化修饰; 前体供应; 生物合成; 细胞工厂

中图分类号: Q31 **文献标志码:** A

Compatibility between synthetic pathway and chassis cells from the viewpoint of post-translational modifications

YOU Di¹, YE Bangce^{1,2}

(¹Laboratory of Biosystems and Microanalysis, State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; ²Institute of Engineering Biology and Health, Collaborative Innovation Center of Yangtze River Delta Region Green Pharmaceuticals, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China)

Abstract: The complexity of chassis cell influences the effectiveness of synthetic constructs and resource allocation. The effect of regulatory systems on the engineered biosynthetic pathways in microorganisms remains incompletely understood. Acyl-CoAs function as key precursors for the biosynthesis of various natural products as well as the dominant donors for protein acylation. Increasing supply of acyl-CoAs contributes to the increased yield, while oversupply also leads to an increase in the global acylation level thereby decreasing the biosynthesis of natural

收稿日期: 2020-02-28 修回日期: 2020-04-08

基金项目: 国家自然科学基金 (31730004和31700058); 国家重点研发计划“合成生物学”重点专项 (2018YFA0900404)

引用本文: 尤迪, 叶邦策. 从翻译后修饰角度解析人工合成途径与底盘细胞的适配性[J]. 合成生物学, 2020, 1(2): 212-225

Citation: YOU Di, YE Bangce. Compatibility between synthetic pathway and chassis cells from the viewpoint of post-translational modifications [J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(2): 212-225

products. Here we provide an overview of the host-construct interactions in the view of the intricate balance of cellular concentrations for acyl-CoAs and the yields of acyl-CoAs-derived products. In particular, we highlight the application of post-translational modification metabolic engineering (PTM-ME) on the biosynthesis of erythromycin, butanol and pinosylvin biosynthesis *via* raising acyl-CoAs supply, and in the same time bypassing the feedback inhibition caused by acylation. In conclusion, the system-level understanding of PTM with proteins offers a conceptual and technological framework for creating new metabolic enzymes/pathways to optimize the optimal production of desired products.

Key words: PTM-ME; acylation; precursor supply; synthetic biology; cell factory

自20世纪初创建以来,合成生物学突破了传统的“自上而下”理念,形成了以人工设计为主导、系统化和标准化生物技术为手段的“自下而上”正向工程学思路,构建标准化和通用型的生物元件模块(如基因线路、酶、代谢途径等),在简约型底盘细胞中进行整合、测试和优化,实现定量可控的平台化新生命系统的高效运行。基于合成生物学的工业生物技术也成为了解决当前人类健康、资源、能源和环境等问题最具潜力的技术方法。在合成生物学的飞速发展过程中,产物合成核心元件的标准化及其与底盘细胞的适配性则是制约人工生物合成系统“能力提升”的“卡脖子”问题^[1]。为了克服这一难题,我们必须解决以下几个基础问题:阐明合成代谢调控机制,建立微生物合成的理论与方法,设计及构建人工微生物合成体系(工程化菌种),实现生物合成的定向性和高效性。

现有的产业化应用菌株主要是通过传统的随机选育方法或单一代谢途径修饰的方法获得。生物学家逐渐发现,传统的代谢工程方法仅仅通过合成途径的优化改造,对于高效生物合成的作用是非常有限的,甚至导致对细胞行为的不良影响,危及整个工程菌的性能^[2-3]。随着生命科学技术的发展,系统生物技术方法、网络调控分子机制、人工元件设计及模型优化已经越来越渗透到微生物合成体系研究领域^[4-6],微生物高效合成产物主要取决于合成途径中关键节点酶的催化效率及前体供应,考虑到合成代谢通路的动力学控制并不仅仅局限在一个单独的反应或途径中,而是分布在整个网络甚至整

个系统中,微生物合成的工程改造必须从单个代谢途径的优化转变到代谢调控网络及生物系统的优化(图1)。因此,加深理解微生物合成代谢与调控的分子基础,揭示工程化设计的(内源及外源)生物合成体系与细胞整体代谢网络的交互作用及适配性机制是当前微生物合成理论与方法研究的重要方向。

微生物拥有极其复杂的调控网络和响应机制以应对培养环境及胞内代谢状态变化,利用多种调控模式调节胞内代谢网络及代谢流分布^[4, 7-12]。已有的研究表明,微生物细胞调控其(内源性或嵌入性)工程化设计生物合成体系有以下3种方式:基因转录及翻译调节胞内代谢酶丰度^[13-15];变构效应及翻译后修饰调控胞内代谢酶活性^[16-17];前体供应及辅因子浓度影响合成代谢反应速率^[18-19]。与此同时,代谢工程及合成生物学的研究重点也相应地聚焦在:生物合成元件的挖掘、设计、优化、改造及组装;调控元件及调控网络优化,维持合成代谢酶的高表达;前体及辅因子工程,强化前体与辅因子供应;代谢酶优化改造,解除产物的变构反馈抑制。这些分工明确的系统性研究深化了对微生物合成理论与方法的理解,实现了微生物药物^[20-23]、生物燃料及化学品^[24-27]、生物基聚合物^[28-30]的高效合成。然而,作为微生物固有体系的组分,翻译后修饰(post-translational modification, PTM)系统对工程化生物合成途径的调控机制及合成效率的影响仍缺乏系统研究,基于翻译后修饰的代谢工程及合成生物学也鲜有报道。

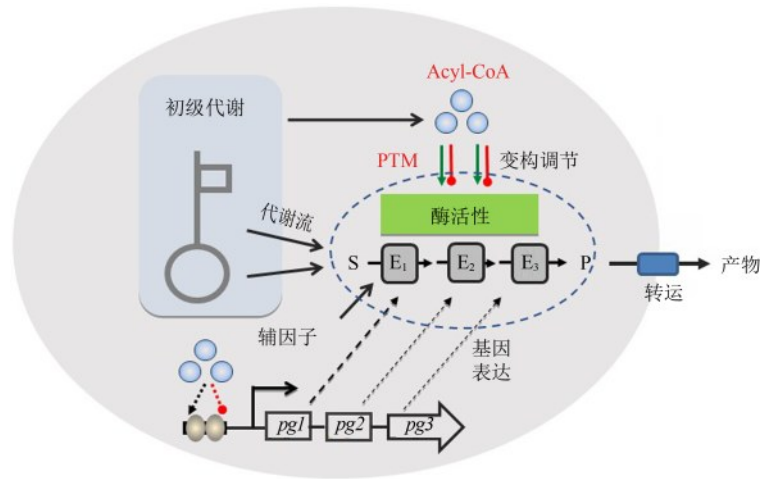


图1 底盘细胞对人工生物合成途径的影响
(基因表达调控、前体及辅因子供应、酶活性调控和产物转运等)

Fig. 1 Effect of chassis cells on artificial biosynthesis pathways

(gene expression regulation, precursor and cofactor supply, enzyme activity regulation, product transport, etc.)

1 酰基 CoA 与蛋白质酰基化修饰

蛋白质翻译后修饰是一种所有生命体都广泛存在的重要调控机制，主要包括磷酸化、甲基化、酰基化等。PTM 能够通过酶活性调节，改变亚细胞定位、与分子伴侣间相互作用、蛋白质稳定性及其与 DNA 结合能力等方式，赋予其修饰蛋白质全新的功能和性质。

以酰基化为代表的蛋白质翻译后修饰一直是广受追捧的研究热点。1964 年 Allfrey 和同事首次在真核细胞中，发现了组蛋白的赖氨酸存在乙酰化修饰，并指出这种乙酰化修饰具有重要的转录调控功能^[31-32]；1997 年非组蛋白（如肿瘤抑制蛋白 p53）中也发现了赖氨酸乙酰化修饰的存在^[33]；2002 年更进一步发现了原核细胞中可逆赖氨酸乙酰化（reversible lysine acylation, RLA）对乙酰 CoA 合成酶活性的调控机制^[34]。随着高分辨率质谱技术的发展，越来越多的研究证实 RLA 是一种真核细胞及原核细胞中都广泛存在的蛋白质功能调控模式^[34-36]。

蛋白质的乙酰化是一个动态可逆的过程，生物体存在两种蛋白质乙酰化机制：①酶催化机制，通过乙酰转移酶将乙酰 CoA 上的乙酰基团转移到赖氨酸侧链氨基；②非酶乙酰化机制，酰基化反应是高放热反应，且形成的酰胺键非常稳定，细

胞内高浓度的乙酰 CoA 或乙酰磷酸（AcP）在碱性 pH 条件下可自发乙酰化蛋白质赖氨酸的侧链氨基^[37-38]。由于两种乙酰化机制（酶催化和非酶催化）在细胞中同时存在，目前尚无有效方法区分底物蛋白的乙酰化修饰是由哪种机制产生。去乙酰化反应是蛋白质乙酰化的逆向反应，在酶催化和非酶催化的乙酰化反应中，有部分能通过去乙酰化酶的催化脱去乙酰化，另一部分则不能发生去乙酰化，细胞如何处理这些不能脱去乙酰化的蛋白质的机理尚不明确。

乙酰化中和了赖氨酸 ϵ -氨基的正电荷，提高其疏水性的同时增大赖氨酸侧链体积。因此，赖氨酸的乙酰化会抑制其侧链形成氢键，及其与负电荷残基发生静电相互作用的能力，却能增加与其他蛋白相互作用的范德华力。除了乙酰基基团之外，其他酰基基团也可以酰基化赖氨酸的侧链氨基，如丙酰化^[39]、丁酰化^[40]、琥珀酰化^[41]、丙二酰化^[42]、戊二酰化^[43]、巴豆酰化^[44]、 β -羟基丁酰化^[45]，以及最新发现的苯甲酰化^[46]、乳酸化^[47]等。不同的酰基化修饰造成了蛋白质结构和性质的多元性，以调节酶催化活性、蛋白质稳定性或与其他分子间相互作用的方式影响细胞的代谢过程。根据酰基基团性质的不同，酰基化修饰可分为 3 类：①疏水非极性酰基化，例如丙酰化、丁酰化和巴豆酰化，它们在乙酰化赖氨酸残基的基础

上, 延伸了烃链, 进一步增加其疏水性; ②极性酰基化, 例如 β -羟基丁酰化和2-羟基异丁酰化, 其特点是包含一个可与其他分子形成氢键的羟基; ③酸性酰基化, 例如丙二酰化、琥珀酰化和戊二酰化, 这种类型的酰基化修饰能使赖氨酸电荷由+1变为-1, 电荷改变程度与磷酸化相当(由0到-2), 因此, 这类酰基化修饰与前两类差异显著。这些修饰基团结构和功能的多样性无疑增加了蛋白质修饰机制与调控研究的复杂性^[36]。

酰基化修饰的发生与基础营养代谢的失衡紧密相关。微生物细胞内氮源匮乏或碳流溢出导致胞内AcP和乙酰CoA积累, 继而引发高水平的蛋白质乙酰化, 这些乙酰化蛋白多为代谢酶并且大量分布于TCA循环、糖酵解、脂肪酸代谢、丙酮酸代谢等多种中心代谢途径, 缓冲碳流过量带来的压力, 反馈影响中心代谢, 葡萄糖、乙酸、乳酸等碳源的过量均能导致这种乙酰化反馈效应^[38, 48-49]。

随着翻译后修饰蛋白质组学技术的发展, 越来越多的研究证实, 蛋白质酰基化水平的改变依赖于与之对应的酰基CoA浓度。微生物中不同的酰基CoA来源也不尽相同, 例如, 乙酰CoA和琥珀酰CoA主要来源于TCA循环, 丙二酰CoA主要来源于乙酰CoA羧化酶催化的乙酰CoA羧化反应(脂肪酸合成的第一步反应)。因此, 乙酰化和琥珀酰化可能与能量代谢关联, 丙二酰化修饰则可能与脂肪酸代谢相关。这种推测在随后的研究中得到证实, 由葡萄糖/丙酮酸添加引起的糖酵解及TCA循环增强, 细胞内乙酰化和琥珀酰化修饰水平也随之提升^[50]; 抑制脂肪酸合成酶的情况下, 丙二酰CoA累积, 细胞内蛋白质丙二酰化水平也随之升高^[51]。此外, 外源脂肪酸盐的添加同样会引起细胞内酰基化水平的波动, 乙酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐或丁酸盐的添加均能通过增加胞内相应酰基CoA积累引起酰基化修饰水平的显著提高^[52]。

2 酰基CoA与微生物天然产物合成

微生物, 是目前已知的天然产物或次级代谢产物合成的主要底盘细胞, 利用微生物生产所得的次级代谢产物例如抗生素、生物碱、萜类、酚

类等广泛地应用于医药和农业为代表的多种产业中。葡萄糖、脂肪酸、氨基酸等营养物质的基础代谢为次级代谢产物合成提供所需的各种酰基CoA类前体和辅因子, 这些前体物质的供给充足是产物合成的先决和保障, 前体物质的供应能力也在一定程度上决定和制约着产物的合成能力。

2.1 酰基CoA积累促进产物合成

乙酰CoA不仅是TCA循环的必需组分, 也是细胞内脂质、氨基酸和次级代谢产物合成的重要前体, 乙酰CoA还能通过各种途径转化生成其他酰基CoA, 用于更多代谢产物如聚酮类、芪类、黄酮类、生物能源类及生物材料等物质的合成。聚酮类化合物具有多样的分子结构、功能和生物活性, 比如抗细菌(红霉素、四环素)、抗真菌(灰黄霉素、两性霉素)、抗寄生虫(阿维菌素、奈马克丁)、抗癌(多柔比星)以及免疫抑制(雷帕霉素)等。聚酮类物质的合成与脂肪酸合成类似, 是一种链延伸式的合成方式: 在聚酮合酶(PKSs)的催化作用下, 以酰基CoA为起始单元, 不同类型的其他酰基CoA(如乙酰CoA、丙酰CoA、丙二酰CoA、甲基丙二酰CoA等)为延伸单元, 重复脱羧缩合形成聚酮链环。例如, 红霉素多孢菌的红霉素合成, 一个起始单元丙酰CoA和六个延伸单元甲基丙二酰CoA由多个PKSs催化缩合形成红霉素的主环6-脱氧红霉内酯B(6-dEB); 抗生素链霉菌的竹桃霉素合成, 以乙酰CoA为起始单元, 6个甲基丙二酰CoA为延伸单元; 委内瑞拉链霉菌的酒霉素合成, 以丙酰CoA为起始单元, 1个丙二酰CoA和4个甲基丙二酰CoA为延伸单元; 诺尔斯链霉菌的制霉菌素合成, 以乙酰CoA为起始单元, 3个甲基丙二酰CoA及15个丙二酰CoA为延伸单元等。植物合成的芪类和黄酮类化合物(例如赤松素和白藜芦醇), 是由植物特有的PKS III催化丙二酰CoA合成, 在微生物中通过合成生物学方法设计合成途径, 异源表达PKS III, 也能实现这类物质的高效合成。生物能源类物质(如丁醇、长链脂肪醇、脂肪酸及烷烃等), 多以乙酰CoA、丙二酰CoA及其他酰基CoA为合成前体。聚羟基脂肪酸酯(PHA)由乙酰CoA及各种羟基脂酰CoA聚合而成, 是一种具有良好的生物相容性、生物可降解性和热加工性能的天然高分子生物

材料。

通过代谢工程及合成生物学手段强化酰基 CoA 前体的供应,是提高产物合成效率的常用策略。例如,在黄酮类物质的生物合成中,通过过表达异源乙酰 CoA 羧化酶和敲除酰基 CoA: 甘油二酯酰基转移酶的方式,优化丙二酰 CoA 合成途径,增强丙二酰 CoA 供应,显著促进泥质链霉菌中光神霉素合成^[18]。在委内瑞拉链霉菌中,敲除前体 (2S) -丙二酸乙酰 CoA 代谢相关基因 *meaA*, 共表达泰乐菌素聚酮合酶与途径特异型调控因子 *PikD*, 增强前体供应,使泰乐酮产量提高了 10 倍^[19]。在红霉素的工业生产中,利用适量浓度正丙醇的添加,增强丙酰 CoA 供应,激活丙酰 CoA 羧化酶,加速甲基丙二酰 CoA 的转化率,可提高红霉素的产量^[53-54]; 通过敲除丙酰 CoA 羧化酶的负调控蛋白 *PccD*, 提高丙酰 CoA 的同化效率和甲基丙二酰 CoA 供应,实现了红霉素产量的翻倍^[55]。在天蓝色链霉菌中,敲除 *G6P* 脱氢酶和过表达乙酰 CoA 羧化酶,增强丙二酰 CoA 的供应,最终使放线菌素的产量提高了近 5 倍^[56]。

在萜类物质的合成中,通过增加丙二酰 CoA 供应,同样可以实现白藜芦醇和赤松素生物合成的显著提高^[57-58]。在倍半萜青蒿素的前体紫穗槐二烯的生物合成中,通过过表达乙醛脱氢酶和乙酰 CoA 合成酶,增强乙酰 CoA 代谢流,使得紫穗槐二烯产量提高了一倍^[59]。通过重塑中心代谢的方式,提高胞内乙酰 CoA 供应,实现倍半萜烯类化合物法呢烯 (β -farnesene) 发酵单位达 130g/L^[60]。在生物能源类物质的生物合成中,提高乙酰 CoA 供应,可使正丁醇产量提升 2 倍,在此基础上继续敲除乙醇脱氢酶 *ADH1-5* 和过表达乙醛脱氢酶突变体 *adeEA267T/E568K*, 强化乙酰 CoA 供应,正丁醇产量进一步增加了 40%^[61]。

除了提高前体酰基 CoA 的供应之外,消除与产物合成无关的酰基 CoA 消耗也是强化前体供应的有效手段。以常用的底盘细胞大肠杆菌为例,高速增长期代谢溢出产生的乙酸是有氧发酵的主要副产物,乙酸积累对细胞生长和产物合成都有负面影响,是一种碳源的损耗^[62]。因此,针对这种碳源损耗的代谢工程改造有利于提高产物的合成。

乙酸主要来源于两个途径: 磷酸转乙酰基酶/乙酸激酶 (*Pta/AckA*) 途径和丙酮酸氧化酶 (*PoxB*)

途径^[63]。在大肠杆菌中,敲除 *pta* 能够有效减少乙酸生成,同时增加产物白介素-2 和脂肪酶的合成^[64-65]; 敲除 *pta* 同样能使脂肪酸产量提高 20%^[66]; 同时敲除 *pta* 和 *ackA* 可使乙酸异戊酯产量增加一倍^[67], 在此基础上继续敲除 *poxB* 虽然能进一步降低乙酸生成,但产物产量却没有随之增加^[68]。在真氧产碱杆菌和棕色固氮菌中采用相同的策略,同样实现聚羟基丁酸酯 (PHB) 产量提高 2.5 倍^[69-71]。McCleary 等^[72] 认为,敲除 *Pta/AckA* 途径能有效减少乙酸的生成,但也会造成 ATP 和 AcP 合成受限,可能在一定程度上影响细胞的生长代谢。对此, Kim 等^[73] 采用反义 RNA 技术降低 *Pta/AckA* 表达水平,也可实现产物产量 2 倍的增长。

为了实现产物合成的最优化,除了针对 *Pta/AckA* 途径和 *PoxB* 途径的敲除/敲低之外,也需要配合其他竞争途径关键酶的敲除改造。例如,组合敲除 *ackA*、乳酸脱氢酶和富马酸还原酶,可使乙醇产量提高 2 倍^[74]; 组合敲除乳酸脱氢酶、乙醇脱氢酶和富马酸还原酶,可使正丁醇产量提高 1 倍^[75]; 组合敲除 *pta*、富马酸还原酶、乳酸脱氢酶和乙醇脱氢酶,结合培养条件的优化,可使丁酸盐终产量提高近 10 倍^[76]。

2.2 酰基 CoA 积累诱发酰基化抑制效应

外源性或内源性因素引起的细胞内酰基 CoA 波动是翻译后修饰调控系统启动的“开关”。胞内酰基 CoA 的累积诱发产物合成相关代谢途径大量代谢酶和调控蛋白的酰基化,抑制终产物合成,这种翻译后修饰引发的反馈调控主要表现在两个层面: 转录层面调控和翻译后修饰层面调控。

转录层面的调控主要通过调节相关转录调控因子的酰基化水平实现。微生物的生长过程往往伴随着碳、氮、磷等营养物质的供给波动,由不同转录因子介导的转录调控能够消除营养物质剧烈波动引起的代谢紊乱,以及由此产生的对细胞生长、分化、繁殖和次级代谢产物合成的不良影响。大量的研究发现,胞内许多转录调控因子是酰基化的修饰底物,其修饰位点多位于 DNA 结合结构域,通过改变赖氨酸的电荷,抑制与 DNA 的结合活性的方式影响靶基因的转录^[77-79]。例如,类

球红细菌中氧敏调控因子 FnrL 的乙酰化抑制其与靶标 DNA 的相互作用^[80]；沙门氏菌中亮氨酸响应调控因子 Lrp 的乙酰化导致其 DNA 结合活性的显著降低^[81]，毒力调控因子 PhoP 的乙酰化能降低其毒性^[82]，毒力调控因子 HilD 的乙酰化能增强其稳定性^[83]；天蓝色链霉菌中氮调控因子 GlnR 的多位点乙酰化显著抑制其 DNA 结合能力和协同调控能力^[84]；红霉菌多孢菌中磷调控因子 PhoP 的丙酰化强烈抑制其 PHO 结构域的 DNA 结合活性，削弱对靶基因的调控能力^[85]。微生物的生长和次级代谢产物合成过程并非依赖某一调控因子的单线调控，而是涉及更为复杂的包括全局调控因子和特异性调控因子在内的多线交互调控^[86-87]，这些调控因子的酰基化修饰，在影响靶基因转录的同时，也可能对初级代谢和次级代谢产生其他重要的影响。

翻译后修饰层面的调控则是通过酰基化酰基 CoA 合成的催化酶，调节其酶活性实现。虽然不同酰基 CoA 的来源有所不同，但是内/外源的脂肪酸同化是其共通的来源途径。微生物细胞脂肪酸的同化途径有三种：酰基 CoA 合成酶途径，酰基 AcP 合成酶途径和脂肪酸激酶途径。其中，酰基 CoA 合成酶途径的催化酶是最为典型的酰基化修饰底物。以乙酰 CoA 合成酶 (Acs) 为例，其活性受到关键位点的可逆乙酰化调控，乙酰化能够直接抑制有机酸的腺苷化和乙酰 CoA 的合成^[88]，已有的研究报道涉及大肠杆菌^[89-90]、假单胞菌^[91]、枯草芽孢杆菌^[92]、链霉菌^[93-96]和分枝杆菌^[97]等多种微生物。除了 Acs 以外，其他酰基 CoA 合成酶也存在类似的翻译后修饰调控，酰基 CoA 合成酶的活性对于细胞生长和次级代谢产物合成尤为重要，其活性异常不仅会导致酰基 CoA 供应异常、胞内能量失衡、严重时甚至还会引发细胞的生长缺陷^[98-99]。

酰基化修饰对代谢酶或调控因子转录水平和翻译后修饰水平的双层调控会直接影响酰基 CoA 类前体的有效供应和次级代谢产物的合成。例如，以丙酰 CoA 为前体的红霉素合成途径中，外源添加正丙醇或丙酸盐会诱发全局调控因子 PhoP 以及红霉素合成途径催化酶丙二酸半醛脱氢酶、丙醛脱氢酶、SAM 合成酶和丙酰 CoA 合成酶的丙酰化，抑制红霉素合成基因簇的转录、前体丙酰 CoA 的利用和红霉素合成^[100]；以丙二酰 CoA 为前

体的十一烷基灵菌红素生物合成中，丙二酸盐添加引起高水平的蛋白质丙二酰化，抑制产物的合成^[101]；以丁酰 CoA 为前体的丁醇合成过程中，丁醇合成途径代谢酶的丁酰化也抑制了终产物的合成^[101]；在人工构建的大肠杆菌细胞工厂用于赤松素的合成过程中，同样存在由于产物合成途径催化酶（4-对香豆酸连接酶和芪合成酶）的丙二酰化抑制了催化活性，从而导致赤松素的产率下降^[16]。

综上所述，酰基 CoA 积累对合成代谢具有双重效应：一方面，前体供应的增加，能够促进生物合成效率；另一方面，酰基化供体的增加，会造成合成代谢途径相关酶的酰基化水平提高，抑制代谢酶催化活性及产物合成效率。因此，解析酰基 CoA “双重身份”——酰基化供体及代谢前体之间的相互影响与平衡，揭示酰基化修饰对合成代谢酶活性的调控机制，从酰基 CoA 平衡及蛋白质翻译后修饰角度研究微生物（内源或外源）合成途径与底盘细胞自身代谢网络的互作机制，协调合成途径各元件之间、合成途径与底盘细胞之间的适配性等是微生物合成体系设计与优化需要解决的共性科学问题（图2）。

3 翻译后修饰代谢工程策略及应用

酰基 CoA 的代谢枢纽地位，以及在基础营养代谢和合成代谢之间“承上启下”的角色，推动了一系列围绕酰基 CoA 展开的代谢工程和生物合成设计与改造工作。以工程策略侧重点的不同，分为传统的“开源节流型”——增加前体供应的同时消除竞争途径的消耗，和新型的“平衡型”——翻译后修饰代谢工程改造策略。

翻译后修饰代谢工程 (PTM-ME) 是 2018 年由我国科学家提出的一种新型的微生物合成代谢优化设计策略^[16-17]，与传统策略所不同的是，该策略集合了传统策略“开源节流”的优点，取长补短，从酰基 CoA 平衡及蛋白质翻译后修饰角度分析微生物内源性或嵌入性工程化设计生物合成体系与细胞整体代谢网络之间的互作机制，通过调节和优化代谢酶/酰基化系统，提高合成代谢途径代谢流以及与底盘细胞的适配性（图3）。该策略

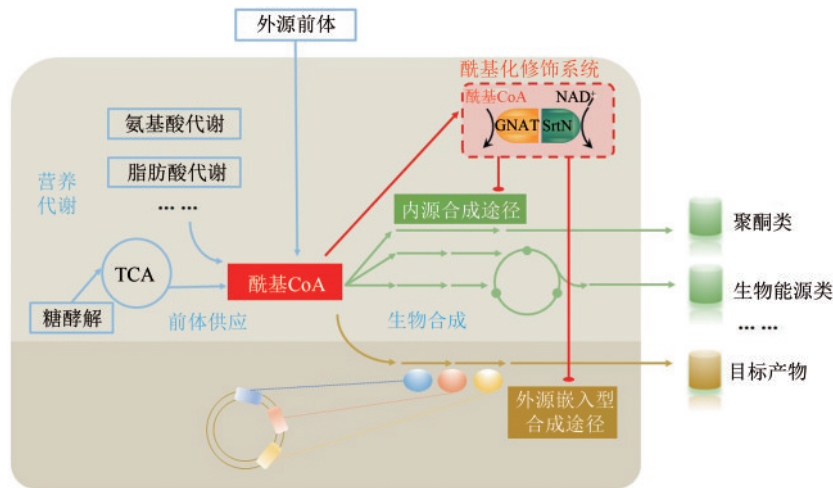


图2 酰基 CoA 积累对合成代谢的双重效应

Fig. 2 Dual effects of acyl-CoA accumulation on anabolism

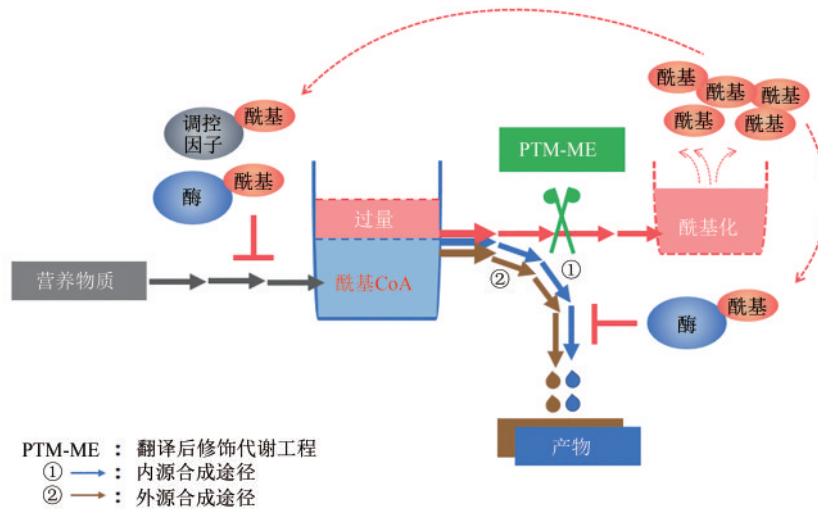


图3 翻译后修饰代谢工程策略原理示意图

Fig. 3 Schematic diagram for the PTM-ME strategy

的基本路线是：解析酰基化代谢的调控机制→筛选产物反馈抑制的关键靶点→代谢酶酰基化的脱敏改造或酰基化系统的优化改造，消除反馈抑制，强化产物合成。目前，PTM-ME策略已成功应用于聚酮化合物（红霉素）、生物能源类物质（丁醇）以及芪类化合物（赤松素）的高效合成。

3.1 PTM-ME 应用于红霉素的高效合成

红霉素是医药和畜牧业中常用的大环内酯类抗生素。在红霉素的发酵生产过程中，研究者发现蛋白质丙二酰化和丙酰化会影响菌体生长及红霉素的合成，且胞内丙二酰化/丙酰化水平与产物合成

效率呈负相关^[17, 85, 100-101]。红霉素合成前体丙二酰 CoA/丙酰 CoA 的适量供应有利于产物合成，当前体丙二酰 CoA/丙酰 CoA 积累过量时，又会产生酰基化效应，抑制产物合成。Xu 等^[85]运用丙二酰化修饰组学技术，从 132 个蛋白上共鉴定到 192 个丙二酰化修饰位点，结合生物信息学分析发现丙二酰化修饰蛋白在核糖体及中心代谢途径中显著富集，其中，乙酰 CoA 合成酶 (Acs) 和谷氨酰胺合成酶的活性受到丙二酰化的显著抑制。由于正丙醇或丙酸盐添加是提高红霉素发酵单位的常用手段，研究者随后对丙酰化组学的研究证实，酰基 CoA 浓度的动态改变会引起蛋白质酰基化水平与

红霉素产量随之改变的连锁反应。利用定量酰基化组学技术，酶学特征分析和酰基化模拟分析，研究者确定了丙酰化修饰是影响红霉素产量的关键修饰，从两个层面负调控红霉素的合成：一是通过抑制丙二酸半醛脱氢酶（MmsA2）、丙醛脱氢酶（Adh）、SAM合成酶（SAMS）和丙酰 CoA 合成酶（PrpE）的活性阻碍丙酰 CoA 的合成；二是通过对全局调控因子 PhoP 的抑制，降低其 PHO 结构域的 DNA 结合活

性，削弱靶基因红霉素合成基因簇的转录^[13]以及细胞对碳源的利用。在此基础上，研究者利用 PTM-ME 策略，对酰基化酶和酰基化修饰系统分别进行了脱敏和优化改造。通过敲除丙酰转移酶（GNAT）、过表达去丙酰化酶（SrtN）和酰基化不敏感酶（SACE_1780）等方式，消除丙酰化对红霉素合成的抑制作用，最终实现工业高产菌株中红霉素的产量翻番^[81, 96-97, 99]（图4）。

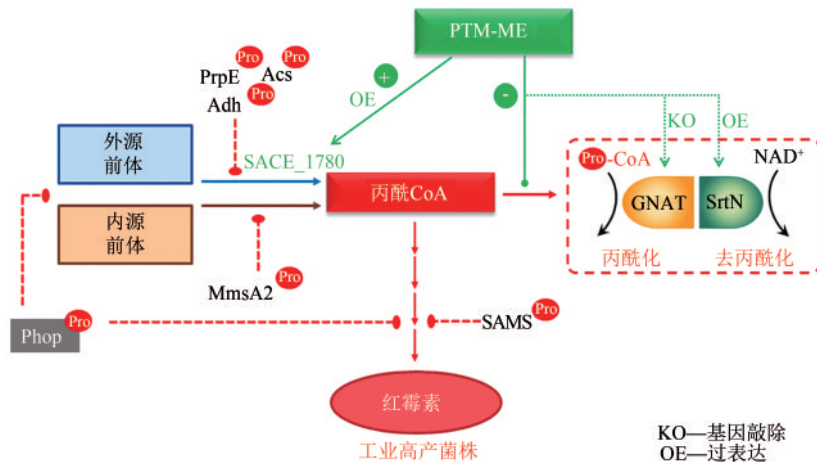


图4 PTM-ME应用于红霉素的高效合成示意图

Fig. 4 Efficient synthesis of erythromycin with the PTM-ME strategy

3.2 PTM-ME 应用于丁醇的高效合成

在生物能源类物质丁醇的生物合成中，丙酮丁醇梭菌由产酸期到产醇期的过渡伴随着由生长状态到孢子状态的转变，以及胞内 AcP 和丁酰磷酸（BuP）含量的升高，从而导致对数中后期胞内乙酰化和丁酰化水平的升高^[97]。研究者通过定量酰基化组学分析，一共鉴定到458个乙酰化位点和1109个丁酰化位点，显著富集于丁醇合成相关的丙酮酸途径、丁酸盐途径和丁酰 CoA 合成途径。结合深入的分析挖掘，筛选出了由于活性受到乙酰化/丁酰化抑制而影响菌体产醇的代谢酶，包括醇/醛脱氢酶 AdhE1、丁醛脱氢酶 BdhA、乙酰 CoA 酰基转移酶（CA_C2873）、3-羟基丁酰 CoA 脱氢酶（Hbd）、3-羟基丁酰 CoA 脱氢酶（Crt）、丁基 CoA 脱氢酶（Bcd）等^[101]。利用 PTM-ME 策略对这些代谢酶的进行改造，也能够一定程度上消除

丁酰化的反馈抑制，提高丁醇产量（本文作者团队未发表的数据）。

3.3 PTM-ME 应用于大肠杆菌人工合成赤松素的高效合成

PTM-ME 除了能应用于内源性生物合成途径的优化改造，对于嵌入型生物合成途径的优化及其与底盘细胞适配性的调节同样适用。以赤松素为例，研究者在底盘细胞大肠杆菌中嵌入了赤松素的3个合成元件：苯丙氨酸氨基裂解酶 PAL，4-对香豆酸 CoA 连接酶 4CL 和芪合成酶 STS。其运作原理是，PAL 利用苯丙氨酸转化生成反式-肉桂酸，经 4CL 催化生成反式-肉桂酰 CoA，再由 STS 催化与三分子丙二酰 CoA 缩合生成终产物赤松素。

在人工构建的赤松素合成过程中，由于丙二酰 CoA 前体的供应是赤松素合成的限速步骤，因

此添加丙二酰 CoA 激活剂浅蓝霉素，能有效提高丙二酰 CoA 前体的供应和赤松素产量^[58]。在随后的浅蓝霉素添加过程中，研究者再次发现了由于酰基化抑制导致的产物合成下降的现象，过量的浅蓝霉素添加诱发了三个合成元件催化酶的丙二酰化修饰，通过抑制 4CL 和 STS 的活性，阻碍赤松素的合成。对此，研究者利用 PTM-ME 策略，对酰基化敏感的

4CL 和 STS 丙二酰化位点进行改造，采取将赖氨酸替换为精氨酸的方式，将其改变为对酰基化不敏感的状态，在一定程度上消除了酰基化抑制效应，使得赤松素产量提高了近两倍（图 5）^[16]。这些研究表明，PTM-ME 策略对于解除内源性及外源性产物合成途径中酰基 CoA 诱发的酰基化反馈抑制、强化产物合成，都具有十分可观的成效。

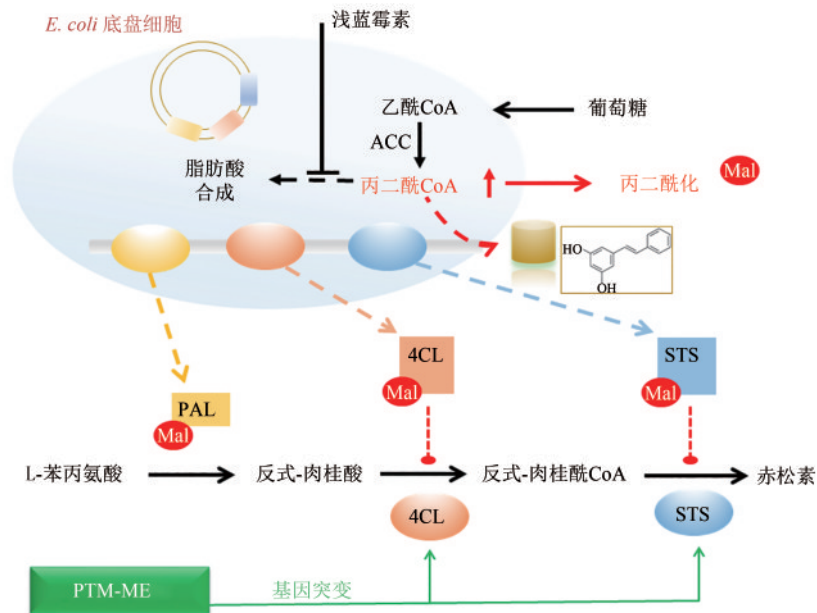


图5 PTM-ME 应用于赤松素的高效合成示意图

Fig. 5 Efficient synthesis of pinosylvine with the PTM-ME strategy

4 总结与展望

基因工程技术和模块元件设计与构建方法的不断进步，加速了以产物合成最优化为导向的“量身定做”型合成生物学的发展进程。但是，构建标准、高效、可控的微生物细胞工厂仍然面临严峻挑战，究其根本，微生物底盘细胞自身的代谢网络与产物合成途径/嵌入式产物合成途径的兼容性一直是亟待解决的核心问题。

虽然已有的代谢工程策略从多个角度，提高前体供应，阻断竞争旁路，尽最大可能实现产物合成通路代谢流的最优化，但是不得否认的是，产量瓶颈极大地阻碍了微生物细胞工厂的开发潜力。寻求产量的突破，从合成生物学的角度来说，“平衡”是不容忽视的，在产物合成途径中前体酰基 CoA 的供应一旦超过了底盘细胞利用极限，就

会触发酰基化效应，也可以理解为酰基化作为一种临时的碳源存储，缓解了碳源过量对细胞的伤害，这也是产物合成途径与底盘细胞“失配性”的体现。如何解决“失配性”向“适配性”的转变，让细胞维持最小的生长所需，实现最大的产物合成，就必须要考虑酰基化修饰对基础代谢和合成代谢的反馈作用。

微生物代谢调控网络极其复杂，内源性或嵌入的工程化设计生物合成体系与细胞整体代谢网络存在多方面多层次交叉互作，PTM-ME 策略正是在增强前体供应代谢工程和消除竞争途径代谢工程的基础上，引入了平衡前体供应和前体利用的理念，以微生物酰基化修饰调控机制为指导，设计针对酰基化修饰的改造靶点，减少酰基化修饰引起的碳损耗及碳流抑制，提高产物合成效率。如果把整个生物合成系统比作一台“电脑”，那么

PTM-ME的角色就是“散热器”，缓解过载运行的热量堆积，保障“CPU”的高速运作。因此，PTM-ME策略不应仅仅局限于代谢工程设计，也可尝试拓展应用于元件工程、线路工程、基因组与细胞工程等领域的设计，促进蛋白质翻译后修饰线路在生物技术领域的推广。虽然PTM-ME技术现处于初级阶段，但可以预见的是，若与其他工程策略的联手组合，结合最新的基因编辑等优质技术，定能实现“1+1>2”的功效，赋予细胞更大更强的产能。我们相信，在不久的将来，翻译后修饰代谢工程及其优化策略能够在智能人工合成途径与底盘细胞的设计、组装、优化以及工业化方面做出重要贡献。

参 考 文 献

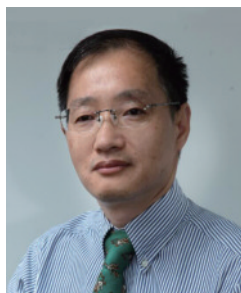
- [1] LAWSON C E, HARCUMBE W R, HATZENPICHLER R, et al. Common principles and best practices for engineering microbiomes [J]. *Nature Review Microbiology*, 2019, 17(12): 725-741.
- [2] ELOUNDOU-MBEBI J M, KUKEN A, OMRANIAN N, et al. A network property necessary for concentration robustness [J]. *Nature Communications*, 2016, 7:13255.
- [3] MAIA P, ROCHA M, ROCHA I. In silico constraint-based strain optimization methods: the quest for optimal cell factories [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2016, 80(1):45-67.
- [4] FUHRER T, ZAMPIERI M, SEVIN D C, et al. Genome-wide landscape of gene-metabolome associations in *Escherichia coli* [J]. *Molecular Systems Biology*, 2017, 13(1):907.
- [5] SHAO Y, LU N, WU Z, et al. Creating a functional single-chromosome yeast [J]. *Nature*, 2018, 560(7718):331-335.
- [6] SHAO Y, LU N, XUE X, et al. Creating functional chromosome fusions in yeast with CRISPR-Cas9 [J]. *Nature Protocols*, 2019, 14(8):2521-2545.
- [7] FEIST A M, HERRGARD M J, THIELE I, et al. Reconstruction of biochemical networks in microorganisms [J]. *Nature Review Microbiology*, 2009, 7(2):129-143.
- [8] FENDT S M, BUESCHER J M, RUDROFF F, et al. Tradeoff between enzyme and metabolite efficiency maintains metabolic homeostasis upon perturbations in enzyme capacity [J]. *Molecular Systems Biology*, 2010, 6:356.
- [9] HEINEMANN M, SAUER U. Systems biology of microbial metabolism [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(3): 337-343.
- [10] LINK H, KOCHANOWSKI K, SAUER U. Systematic identification of allosteric protein-metabolite interactions that control enzyme activity *in vivo* [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(4):357-361.
- [11] ORTH J D, CONRAD T M, NA J, et al. A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism [J]. *Molecular Systems Biology*, 2011, 7:535.
- [12] WANG Q, ZHANG Y, YANG C, et al. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux [J]. *Science*, 2010, 327(5968):1004-1007.
- [13] XU Y, YOU D, YAO L L, et al. Phosphate regulator PhoP directly and indirectly controls transcription of the erythromycin biosynthesis genes in *Saccharopolyspora erythraea* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1):206.
- [14] LIAO C H, XU Y, RIGALI S, et al. DasR is a pleiotropic regulator required for antibiotic production, pigment biosynthesis, and morphological development in *Saccharopolyspora erythraea* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(23):10215-10224.
- [15] RIGALI S, TITGEMEYER F, BAREND S, et al. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by streptomycetes [J]. *EMBO Reports*, 2008, 9(7):670-675.
- [16] XU J Y, XU Y, CHU X H, et al. Protein acylation affects the artificial biosynthetic pathway for pinosylvin production in engineered *E. coli* [J]. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(5):1200-1208.
- [17] YOU D, WANG M M, YIN B C, et al. Precursor supply for erythromycin biosynthesis: engineering of propionate assimilation pathway based on propionylation modification [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(2):371-380.
- [18] BILYK O, LUZHETSKYY A. Metabolic engineering of natural product biosynthesis in *Actinobacteria* [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 42:98-107.
- [19] JUNG W S, KIM E, YOO Y J, et al. Characterization and engineering of the ethylmalonyl-CoA pathway towards the improved heterologous production of polyketides in *Streptomyces venezuelae* [J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2014, 98: 3701-3713.
- [20] LI Y, SMOLKE C D. Engineering biosynthesis of the anticancer alkaloid noscapine in yeast [J]. *Nature Communications*, 2016, 7:12137.
- [21] MEADOWS A L, HAWKINS K M, TSEGAYE Y, et al. Rewriting yeast central carbon metabolism for industrial isoprenoid production [J]. *Nature*, 2016, 537(7622): 694-697.
- [22] PADDON C J, WESTFALL P J, PITERA D J, et al. High-level

- semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin [J]. *Nature*, 2013, 496(7446):528-532.
- [23] THODEY K, GALANIE S, SMOLKE C D. A microbial biomanufacturing platform for natural and semisynthetic opioids [J]. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10(10):837-844.
- [24] BECKER J, LANGE A, FABARIUS J, et al. Top value platform chemicals: bio-based production of organic acids [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 36:168-175.
- [25] CLOMBURG J M, CRUMBLEY A M, GONZALEZ R. Industrial biomanufacturing: the future of chemical production [J]. *Science*, 2017, 355(6320):AAG0804.
- [26] DELLOMONACO C, CLOMBURG J M, MILLER E N, et al. Engineered reversal of the beta-oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals [J]. *Nature*, 2011, 476(7360):355-359.
- [27] DUGAR D, STEPHANOPOULOS G. Relative potential of biosynthetic pathways for biofuels and bio-based products [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(12):1074-1078.
- [28] CHUNG H, YANG J E, HA J Y, et al. Bio-based production of monomers and polymers by metabolically engineered microorganisms [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 36:73-84.
- [29] CLOMBURG J M, BLANKSCHIEEN M D, VICK J E, et al. Integrated engineering of beta-oxidation reversal and omega-oxidation pathways for the synthesis of medium chain omega-functionalized carboxylic acids [J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 28:202-212.
- [30] KIND S, NEUBAUER S, BECKER J, et al. From zero to hero-production of bio-based nylon from renewable resources using engineered *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 25:113-123.
- [31] ALLFREY V G, FAULKNER R, MIRSKY A E. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis [J]. *PNAS*, 1964, 51:786-794.
- [32] ALLFREY V G, MIRSKY A E. Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis [J]. *Science*, 1964, 144(3618):559.
- [33] LUO J, LI M, TANG Y, et al. Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both *in vitro* and *in vivo* [J]. *PNAS*, 2004, 101(8):2259-2264.
- [34] STARAI V J, CELIC I, COLE R N, et al. Sir2-dependent activation of acetyl-CoA synthetase by deacetylation of active lysine [J]. *Science*, 2002, 298:2390-2392.
- [35] CHOUDHARY C, WEINERT B T, NISHIDA Y, et al. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling [J]. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 2014, 15(8):536-550.
- [36] SABARI B R, ZHANG D, ALLIS C D, et al. Metabolic regulation of gene expression through histone acylations [J]. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 2017, 18(2):90-101.
- [37] WAGNER G R, PAYNE R M. Widespread and enzyme-independent nepsilon-acetylation and nepsilon-succinylation of proteins in the chemical conditions of the mitochondrial matrix [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(40):29036-29045.
- [38] WEINERT B T, LESMANTAVICIUS V, WAGNER S A, et al. Acetylphosphate is a critical determinant of lysine acetylation in *E. coli*. [J]. *Molecular Cell*, 2013, 51:265-272.
- [39] GARRITY J G J, HAWSE W, WOLBERGER C, et al. *N*-lysine propionylation controls the activity of propionyl-CoA synthetase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(41):30239-30245.
- [40] CHEN Y, SPRUNG R, TANG Y, et al. Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007, 6(5):812-819.
- [41] ZHANG Z, TAN M, XIE Z, et al. Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification [J]. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7(1):58-63.
- [42] PENG C, LU Z, XIE Z, et al. The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011, 10(12):M111 012658.
- [43] TAN M, PENG C, ANDERSON K A, et al. Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by Sirt5 [J]. *Cell Metabolism*, 2014, 19(4):605-617.
- [44] TAN M, LUO H, LEE S, et al. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification [J]. *Cell*, 2011, 146(6):1016-1028.
- [45] XIE Z, ZHANG D, CHUNG D, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lysine beta-hydroxybutyrylation [J]. *Molecular Cell*, 2016, 62(2):194-206.
- [46] HUANG H, ZHANG D, WANG Y, et al. Lysine benzoylation is a histone mark regulated by Sirt2 [J]. *Nature Communication*, 2018, 9(1):3374.
- [47] ZHANG D, TANG Z, HUANG H, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation [J]. *Nature*, 2019, 574(7779):575-580.
- [48] KUHN M L, ZEMAITAITIS B, HU L I, et al. Structural, kinetic and proteomic characterization of acetyl phosphate-dependent bacterial protein acetylation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4):

- E94816.
- [49] SCHILLING B, CHRISTENSEN D, DAVIS R, et al. Protein acetylation dynamics in response to carbon overflow in *Escherichia coli* [J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 98 (5) : 847-863.
- [50] COLAK G, XIE Z, ZHU A Y, et al. Identification of lysine succinylation substrates and the succinylation regulatory enzyme CobB in *Escherichia coli* [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, 12(12):3509-3520.
- [51] QIAN L, NIE L, CHEN M, et al. Global profiling of protein lysine malonylation in *Escherichia coli* reveals its role in energy metabolism [J]. *Journal of Proteome Research*, 2016, 15(6) : 2060-2071.
- [52] SUN M, XU J, WU Z, et al. Characterization of protein lysine propionylation in *Escherichia coli*: global profiling, dynamic change, and enzymatic regulation [J]. *Journal of Proteome Research*, 2016, 15(12):4696-4708.
- [53] CHEN Y, HUANG M, WANG Z, et al. Controlling the feed rate of glucose and propanol for the enhancement of erythromycin production and exploration of propanol metabolism fate by quantitative metabolic flux analysis [J]. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 2013, 36(10) : 1445-1453.
- [54] EL-ENSHASY H A, MOHAMED N A, FARID M A, et al. Improvement of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* in molasses based medium through cultivation medium optimization [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(10) : 4263-4268.
- [55] XU Z, LIU Y, YE B C. PccD regulates branched-chain amino acid degradation and exerts a negative effect on erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018. DOI: 10.1128/AEM.00049-18.
- [56] RYU Y G, BUTLER M J, CHATER K F, et al. Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(11) : 7132-7139.
- [57] LIM C G, FOWLER Z L, HUELLER T, et al. High-yield resveratrol production in engineered *Escherichia coli* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(10) : 3451-3460.
- [58] VAN SUMMEREN-WESENHAGEN P V, MARIENHAGEN J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the synthesis of the plant polyphenol pinosylvin [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(3):840-849.
- [59] SHIBA Y, PARADISE E M, KIRBY J, et al. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of isoprenoids [J]. *Metabolic Engineering*, 2007, 9(2):160-168.
- [60] MEADOWS A L, HAWKINS K M, TSEGAYE Y, et al. Rewriting yeast central carbon metabolism for industrial isoprenoid production [J]. *Nature*, 2016, 537 (7622) : 694-697.
- [61] SCHADEWEG V, BOLES E. *N*-butanol production in *Saccharomyces cerevisiae* is limited by the availability of coenzyme A and cytosolic acetyl-CoA [J]. *Biotechnol. Biofuels*, 2016, 9:44.
- [62] DE MEY M, DE MAESENEIRE S, SOETAERT W, et al. Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2007, 34 (11):689-700.
- [63] DITTRICH C R, BENNETT G N, SAN K Y. Characterization of the acetate-producing pathways in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology Progress*, 2005, 21(4):1062-1067.
- [64] BAUER K A, BEN-BASSAT A, DAWSON M, et al. Improved expression of human interleukin-2 in high-cell-density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotransacetylase mutant [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(5):1296-1302.
- [65] HAHM D H, PAN J, RHEE J S. Characterization and evaluation of a *pta* (phosphotransacetylase) negative mutant of *Escherichia coli* HB101 as production host of foreign lipase [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, 42(1):100-107.
- [66] LIN H, CASTRO N M, BENNETT G N, et al. Acetyl-CoA synthetase overexpression in *Escherichia coli* demonstrates more efficient acetate assimilation and lower acetate accumulation: a potential tool in metabolic engineering [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71(6):870-874.
- [67] VADALI R V, HORTON C E, RUDOLPH F B, et al. Production of isoamyl acetate in *ackA-pta* and/or *ldh* mutants of *Escherichia coli* with overexpression of yeast AFT2 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 63 (6):698-704.
- [68] DITTRICH C R, VADALI R V, BENNETT G N, et al. Redistribution of metabolic fluxes in the central aerobic metabolic pathway of *E. coli* mutant strains with deletion of the *ackA-pta* and *poxB* pathways for the synthesis of isoamyl acetate [J]. *Biotechnology Progress*, 2005, 21(2) : 627-631.
- [69] CENTENO-LEIJA S, HUERTA-BERISTAIN G, GILES-GOMEZ M, et al. Improving poly-3-hydroxybutyrate production in *Escherichia coli* by combining the increase in the NADPH pool and acetyl-CoA availability [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2014, 105(4):687-696.
- [70] CHANG D E, SHIN S, RHEE J S, et al. Acetate metabo-

- lism in a *pta* mutant of *Escherichia coli* W3110: Importance of maintaining acetyl coenzyme a flux for growth and survival [J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(21): 6656-6663.
- [71] MIYAKE M, MIYAMOTO C, SCHNACKENBERG J, et al. Phosphotransacetylase as a key factor in biological production of polyhydroxybutyrate [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2000, 84-86: 1039-1044.
- [72] MCCLEARY W R, STOCK J B, NINFA A J. Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? [J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(10):2793-2798.
- [73] KIM J Y, CHA H J. Down-regulation of acetate pathway through antisense strategy in *Escherichia coli*: improved foreign protein production [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 83(7):841-853.
- [74] ZHOU S, IVERSON A G, GRAYBURN W S. Engineering a native homoethanol pathway in *Escherichia coli* B for ethanol production [J]. *Biotechnology Letters*, 2008, 30(2):335-342.
- [75] ATSUMI S, CANN A F, CONNOR M R, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production [J]. *Metabolic Engineering*, 2008, 10(6):305-311.
- [76] BAEK J M, MAZUMDAR S, LEE S W, et al. Butyrate production in engineered *Escherichia coli* with synthetic scaffolds [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110(10):2790-2794.
- [77] CHRISTENSEN D G, XIE X, BASISTY N, et al. Post-translational protein acetylation: an elegant mechanism for bacteria to dynamically regulate metabolic functions [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01604.
- [78] VANDRISSE C M, ESCALANTE-SEMERENA J C. Protein acetylation in bacteria [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2019, 73:111-132.
- [79] MARTIN J F, LIRAS P. The balance metabolism safety net: Integration of stress signals by interacting transcriptional factors in streptomyces and related actinobacteria [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2019.03120.
- [80] WEI W, LIU T, LI X, et al. Lysine acetylation regulates the function of the global anaerobic transcription factor FnrL in *Rhodobacter sphaeroides* [J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 104(2):278-293.
- [81] QIN R, SANG Y, REN J, et al. The bacterial two-hybrid system uncovers the involvement of acetylation in regulating of Lrp activity in *Salmonella typhimurium* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7:1864.
- [82] REN J, SANG Y, TAN Y, et al. Acetylation of lysine 201 inhibits the DNA-binding ability of PhoP to regulate *Salmonella virulence* [J]. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(3): E1005458.
- [83] SANG Y, REN J, NI J, et al. Protein acetylation is involved in *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence [J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2016, 213(11):1836-1845.
- [84] AMIN R, FRANZ-WACHTEL M, TIFFERT Y, et al. Post-translational serine/threonine phosphorylation and lysine acetylation: a novel regulatory aspect of the global nitrogen response regulator GlnR in *S. coelicolor* M145 [J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2016, 3:38.
- [85] XU Y, LI Y X, YE B C. Lysine propionylation modulates the transcriptional activity of phosphate regulator PhoP in *Saccharopolyspora erythraea* [J]. *Molecular Microbiology*, 2018, 110(4):648-661.
- [86] LIAO C H, YAO L L, YE B C. Three genes encoding citrate synthases in *Saccharopolyspora erythraea* are regulated by the global nutrient-sensing regulators GlnR, DasR, and CRP [J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 94(5):1065-1084.
- [87] YOU D, ZHANG B Q, YE B C. GntR family regulator DasR controls acetate assimilation by directly repressing the *acsA* gene in *Saccharopolyspora erythraea* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2018. DOI: 10.1128/JB.00685-17
- [88] CHAN C H, GARRITY J, CROSBY H A, et al. In *Salmonella enterica*, the sirtuin-dependent protein acylation/deacylation system (SDPADS) maintains energy homeostasis during growth on low concentrations of acetate [J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 80:168-183.
- [89] CASTANO-CEREZO S, BERNAL V, BLANCO-CATALA J, et al. cAMP-CRP co-ordinates the expression of the protein acetylation pathway with central metabolism in *Escherichia coli* [J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 82(5):1110-1128.
- [90] XU H, HEGDE S S, BLANCHARD J S. Reversible acetylation and inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* acetyl-CoA synthetase is dependent on cAMP [J]. *Biochemistry*, 2011, 50(26):5883-5892.
- [91] CROSBY H A, HEINIGER E K, HARWOOD C S, et al. Reversible N-lysine acetylation regulates the activity of acyl-CoA synthetases involved in anaerobic benzoate catabolism in *Rhodopseudomonas palustris* [J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 76(4):874-888.
- [92] GARDNER J G, GRUNDY F J, HENKIN T M, et al. Control of acetyl-coenzyme a synthetase (AcsA) activity by acetylation/deacetylation without NAD(+) involvement in *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188: 5460-5468.
- [93] LIU X X, LIU W B, YE B C. Regulation of a protein acetyltransferase in *Myxococcus xanthus* by the coenzyme NADP [J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 198(4):623-632.

- [94] YOU D, WANG M M, YE B C. Acetyl-CoA synthetases of *Saccharopolyspora erythraea* are regulated by the nitrogen response regulator GlnR at both transcriptional and post-translational levels [J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 103(5):845-859.
- [95] YOU D, YAO L L, HUANG D, et al. Acetyl coenzyme A synthetase is acetylated on multiple lysine residues by a protein acetyltransferase with a single Gcn5-type *N*-acetyltransferase (GNAT) domain in *Saccharopolyspora erythraea* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(17):3169-3178.
- [96] XU J Y, YOU D, LENG P Q, et al. Allosteric regulation of a protein acetyltransferase in *Micromonospora aurantiaca* by the amino acids cysteine and arginine [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289:27034-27045.
- [97] LIU X X, SHEN M J, LIU W B, et al. Glnr-mediated regulation of short-chain fatty acid assimilation in *Mycobacterium smegmatis* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9:1311.
- [98] STARAI V J, TAKAHASHI H, BOEKE J D, et al. Short-chain fatty acid activation by acyl-coenzyme A synthetases requires Sir2 protein function in *Salmonella enterica* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Genetics*, 2003, 163:545-555.
- [99] YU B J, KIM J A, MOON J H, et al. The diversity of lysine-acetylated proteins in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 18(9):1529-1536.
- [100] XU J Y, XU Z, ZHOU Y, et al. Lysine malonylome may affect the central metabolism and erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* [J]. *Journal of Proteome Research*, 2016, 15(5):1685-1701.
- [101] XU J Y, XU Y, XU Z, et al. Protein acylation is a general regulatory mechanism in biosynthetic pathway of acyl-CoA-derived natural products [J]. *Cell Chemical Biology*, 2018, 25:1-12.



通讯作者:叶邦策(1967—),男,博士,教授,研究方向为合成生物学及智能生物系统设计、生物分析及生物传感研究。

E-mail:bcye@ecust.edu.cn



第一作者:尤迪(1989—),女,博士,副研究员,研究方向为微生物代谢调控与翻译后修饰研究。

E-mail:030111115@mail.ecust.edu.cn