

色氨酸羟化酶 2 理性设计提高大肠埃希菌 5-羟基色氨酸产量

李春辉¹, 杨志彬^{2,3}, 崔金旺^{2,3}, 郝晋博¹, 田俊波^{2,3}, 胡江林², 吕志堂^{1*}

(1.河北大学生命科学学院 河北省微生物多样性研究与应用实验室,河北 保定 071002;

2.河北维达康生物科技有限公司,河北 保定 072152;3.保定保利瑞合生物科技有限公司,河北 保定 072152)

摘要 色氨酸羟化酶(TPH)可催化色氨酸羟化为 5-羟基色氨酸(5-HTP),是 5-HTP 生物合成过程中的关键酶。为了提高大肠埃希菌细胞工厂合成 5-HTP 的效率,通过酶的理性设计和定点突变技术构建了人色氨酸羟化酶 2(TPH2)的系列突变体,并在高产 L-色氨酸且含有 TPH 辅酶四氢生物蝶呤(BH₄)合成与再生模块的大肠埃希菌中表达。发现适当降低酶和色氨酸、酶和 BH₄ 间结合的氢键数目有助于提高 5-HTP 产量;酶和底物色氨酸结合情况不变,辅酶 BH₄ 与酶间氢键数目越多,5-HTP 产量越低。5-HTP 产量最高的细胞工厂是由突变酶 V195A/V197I 构建的,5-HTP 产量较野生酶构建的细胞工厂产量提高 54%,1 L 补料摇床发酵 48 h,5-HTP 产量达 16.17 g/L。理性设计是提高 TPH2 酶活,突破 5-HTP 合成限速步骤的有效途径,TPH2 和底物色氨酸、辅酶 BH₄ 间氢键连接太多或太少都不利于其催化活性的发挥。

关键词 色氨酸羟化酶 2;理性设计;定点突变;5-羟基色氨酸;细胞工厂

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 1005-7021(2024)04-0023-08

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2024.04.003

Rational Design of Tryptophan Hydroxylase 2 for Improving 5-Hydroxytryptophan Production in *Escherichia coli*

LI Chun-hui¹, YANG Zhi-bin^{2,3}, CUI Jin-wang^{2,3}, HAO Jin-bo¹,

TIAN Jun-bo^{2,3}, HU Jiang-lin², LYU Zhi-tang^{1*}

(1. Coll. of Life Sci., Hebei Uni. & Key Lab. of Microb. Diver. Res. & Appl. of Hebei Prov., Baoding 071002;

2. Hebei VDK NaturaSyn Co. Ltd, Baoding 072152; 3. Baoding BLRH Biotech Co. Ltd, Baoding 072152)

Abstract Tryptophan hydroxylase (TPH) can catalyze the hydroxylation of tryptophan to 5-hydroxytryptophan (5-HTP), which is a key enzyme in the biosynthesis of 5-HTP. In order to improve the efficiency of *Escherichia coli* cell factory synthesis of 5-HTP. A series of mutant of human tryptophan hydroxylase-2 (TPH2) was constructed by rational enzyme design and site-directed mutagenesis technique, and expressed in *E. coli* with high L-tryptophan yield and containing TPH coenzyme tetrahydrobiopterin (BH₄) synthesis and the expression in *E. coli* regeneration module. It was found that duly reducing the number of hydrogen bonds between enzyme and tryptophan, enzyme and BH₄ was conducive to increase the yield of 5-HTP. Keep the binding condition of the enzyme to the substrate tryptophan remains unchanged, the higher the number of hydrogen bonds between coenzyme BH₄ and enzyme, the lower the yield of 5-HTP to a certain extent. The cell factory with the highest production of 5-HTP was constructed by mutant enzyme V195A/V197I, and the production of 5-HTP was 54% higher than that of wild enzyme constructed cell factory, and the production of 5-HTP reached to 16.17 g/L 48 h after fermentation in 1 L feeding shaker. Rational design is an effective way to improve TPH2 enzyme activity and break through the limiting step of 5-HTP synthesis. Too much or too little hydrogen bond linkage be-

基金项目:河北省重点研发计划项目(22372403D)

作者简介:李春辉 男,硕士研究生。主要从事生物转化与生物催化研究。E-mail:2905967397@qq.com

* 通讯作者。男,教授,博士,硕士生导师。主要从事微生物资源与系统学研究。E-mail:lzt325@hbu.edu.cn

收稿日期:2023-10-09

tween TPH2 with tryptophan and coenzyme BH_4 is not conducive to its catalytic activity.

Keywords tryptophan hydroxylase 2; rational design; site-directed mutagenesis; 5-HTP (5-hydroxytryptophan); cell factory

作为一种非蛋白质氨基酸,5-羟基色氨酸(5-hydroxytryptophan, 5-HTP)是神经递质血清素(serotonin, 也称为5-羟色胺 5-hydroxytryptamine, 5-HT)和褪黑激素(melatonin)等几种重要生理功能的前体^[1-2], 由于其在抗抑郁、减肥、改善失眠症状、改善帕金森氏综合症和阿尔茨海默病方面的显著功效,因而具有巨大的商业潜力^[3-6]。以前,人们一直从非洲植物加纳籽(*Griffonia simplicifolia*)中采用化学提取的方式生产5-HTP^[7]。由于受到原料的制约,近年来研究者转向以色氨酸为原料通过微生物转化或者直接采用合成生物学的方式以葡萄糖为原料进行发酵生产,并率先由保定保利瑞合生物科技有限公司(现河北维达康生物科技有限公司)利用生物转化法实现产业化生产5-HTP^[8-11]。在动物体内,色氨酸羟化酶(tryptophan hydroxylase, TPH)包含TPH1和TPH2两种组分,其中TPH2是合成血清素的限速酶,且L-色氨酸(L-tryptophan, L-Trp)羟化形成5-HTP过程需要以四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin, BH_4)为辅酶,以 Fe^{2+} 为辅助因子^[12-13]。但是,大肠埃希菌(*Escherichia coli*)完全缺少相应的途径。因此,利用大肠埃希菌构建5-HTP工程菌至少需要在其细胞内表达一种TPH,并且需要在细胞内重构 BH_4 合成与再生途径^[12]。但由于TPH在大肠埃希菌中可溶性表达很差,以及羟化酶活性较低等原因,导致5-HTP产量较低,无法满足工业化生产需求。直到Wang等^[14]成功地在*Escherichia coli* BL21中异源表达 BH_4 依赖性人TPH2途径,并获得高产量的5-HTP(在10 L发酵罐补料发酵40 h产5.1 g/L 5-HTP),人们才有可能通过微生物发酵以葡萄糖为碳源进行5-HTP的工业化生产。Xu等^[15]将L-Trp生物合成途径整合到大肠埃希菌基因组中,并对催化L-Trp合成第一步的3-脱氧-7-磷酸庚二酸合酶(3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase)的启动子强度进行改造以增加L-Trp的产生,调节TPH质粒的拷贝数以提高L-Trp羟化生成5-HTP的效率,最后,在摇瓶中的5-HTP的产量提高到1.61 g/L,与原始生产菌株相比提高了24%,而残留

L-Trp的含量成功地从1.66 g/L降至0.20 g/L。Zhang等^[11]在大肠埃希菌中重构了色氨酸羟化模块、色氨酸合成模块、NADPH再生模块,表达人源TPH2突变体,实现了以葡萄糖为碳源5 L发酵罐补料发酵28 h产8.58 g/L 5-HTP,这是迄今为止报道的以葡萄糖为碳源从头合成5-HTP的最高产量。Wang等^[16]通过曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*)色氨酸羟化酶(*SmTPH*)和人工内源性四氢生物蝶呤(BH_4)模块的异源表达,构建了一种可将L-Trp转化为5-HTP的大肠埃希菌的底盘细胞。然后,利用异色瓢虫(*Harminia axyridis*)的多巴脱羧酶(*HaDDC*)催化5-HTP为5-HT,用于5-HT的产生,最高产量达 (414.5 ± 1.6) mg/L。本研究旨在进一步提升TPH的活性以提高5-HTP的产量,减少催化剂的用量或缩短反应时间,进而降低生产成本,对5-HTP的工业化有重要影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 大肠埃希菌(*Escherichia coli*) TRP- BH_4 ,由保定保利瑞合生物科技有限公司利用BL21(DE3)为底盘构建高产L-色氨酸且含有色氨酸羟化酶(tryptophan hydroxylase, TPH)辅酶四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin, BH_4)合成与再生模块。大肠埃希菌DH5 α -pET28-TPH2所含TPH基因序列系采用人TPH2氨基酸序列(NP_775489.2)野生型(wild type, WT),根据大肠埃希菌密码子优化得到,人工合成后重组质粒pET-28a(+) *Nde* I和*Xho* I之间得到pET-28a/TPH2,转化保存于大肠埃希菌DH5 α 中^[17],由保定保利瑞合生物科技有限公司提供。大肠埃希菌DH5 α 感受态细胞,购自北京索莱宝科技有限公司。

1.1.2 培养基 ①LB(Luria-Bertani)培养基:酵母提取物5.0 g/L,蛋白胨10.0 g/L, NaCl 10.0 g/L,蒸馏水950 mL,调pH至7.0后用去离子水定容至1 L。配制固体培养基时加15 g/L琼脂。②TB(Terrific Broth)培养基:酵母提取物24.0 g/L,胰蛋白胨12.0 g/L, K_2HPO_4 16.43 g/L, KH_2PO_4 2.

31 g/L,甘油 4 mL,pH 7.0。配制固体培养基时加 15 g/L 琼脂。③种子培养基:葡萄糖 30 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 g/L, K_2HPO_4 7.5 g/L, KH_2PO_4 2.5 g/L,酵母提取物 5.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L,柠檬酸 1.5 g/L。另加 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.0 mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.0 mg/L, pH 7.0。④发酵培养基:葡萄糖 10.0 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0 g/L, K_2HPO_4 5.0 g/L,柠檬酸 1.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.4 g/L,酵母提取物 1.5 g/L。另加 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 80 mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.0 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.5 mg/L, pH 6.8。

1.1.3 载体与引物 质粒 pET-28a(+) 购自 Novagen 公司。本研究用到的突变引物序列见表 1,由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 本研究构建的 TPH2 突变体及构建使用的引物序列

Table 1 The constructed TPH2 mutants and the primers used in this work

序号	突变体取代位置	构建突变体所用引物序列
1	N185P	Pr1: GGTTTTAAAGAT CCG GTTTATCGTCAGCG Pr1: CGGATGATCTGCATCC
2	V195A/ V197I	Pr2: CAAGTATTTT GCCG GAT ATC GCAATGGG Pr2: CGACGCTGACGATAAACAT
3	G200N	Pr3: GATGTTGCAATG AAT TACAAATACG Pr3: AACAAAATACTTGCGACGCT
4	T217I	Pr4: GAAGAAGAA ATC AAAACCTGG Pr4: GGTATATTCAACACGCGG
5	T316C	Pr5: GAACCGGAT TGCT GTTCATGAAC Pr5: CGGAGTATACAGCGGATCG
6	C357I	Pr6: CATTGAATTTGGCCTGTG Pr6: GTAAAGAAAT AGAT GTTGCCAGTTTC
7	C396E	Pr7: GATCCGAAAACCACTGTG Pr7: AAATGCTTTA ACTTCT GTCTTTATCGC
8	K398R/ A399P	Pr8: GAAAACCACTGTCTGCAAG Pr8: GGATCAAA CGGACG AACACATGCTTTATC
9	Y446R/ F447Y	Pr9: ACAGAGCATCGAGATCCTG Pr9: GTATACGGATT ATAACG AACGCTAAACG

注:下划线部分为突变氨基酸对应的引物序列

1.1.4 主要试剂与仪器设备 $2 \times \text{Taq}$ PCR Mix (天根 KT201)、质粒小提试剂盒 (DP103,天根)、Q5 定点突变试剂盒 (NEB#E0554S)、卡那霉素 (Amresco,美国药典级)、琼脂糖 (Biowest)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、N,N',N'-四甲基乙二

胺 (TEMED)、过硫酸铵均为超纯级、甲醇 (色谱纯)、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾等均为分析纯。L-色氨酸 (99.87%)、5-HTP (含量 99.62%) 标准品均购自 MCE。PCR 仪 (PowerCycler Gradient SL, 耶拿 Biometra);电转化仪 (Gene Pulser Xcell, Bio-Rad);电泳仪 (DYCZ-MINI2,北京六一);高通量生物反应摇床 (PH08,上海世平实验设备有限公司);高效液相色谱仪 (Agilent LC1200,美国安捷伦公司);可变波长紫外检测器 (G1314B/C);超纯水系统 (Milli-Q,美国密理博);电子分析天平 (Sartorius BL4100,德国 Sartorius)。

1.2 方法

1.2.1 突变位点选择及突变体构建 根据 Hotspot Wizard 3.0 的综合结果,选择突变位点并设计氨基酸变化^[18]。利用人 TPH2 催化结构域 (PDB: 4V06) 建模,采用 AutoDock Vina 进行 TPH2 及其突变体与底物色氨酸、辅酶 BH_4 和辅助因子 Fe^{2+} 的对接^[19]。根据最佳构象从 10 个独立的姿态中选择能量最低的姿态,使用 ProSA-web 进行模型质量分析和检验^[20]。用 PyMOL (Version 2.0, Schrödinger, LLC) 进行最佳构象的可视化呈现。根据选择的突变位点及涉及的氨基酸变化,用 Primer X 在线突变引物设计软件进行点突变引物的设计^[21]。使用 Q5 定点突变试剂盒 (NEB#E0554S) 首先进行高保真 PCR,然后用含 T4 多核苷酸激酶 (NEB #M0201)、T4 DNA 连接酶 (NEB #M0202) 和 *DpnI* (NEB#R0176) 的特殊混合液处理,快速环化 PCR 产物并去除模板,最后转入大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞。菌落 PCR 验证阳性克隆后提取质粒,得到各 TPH2 突变体重组子质粒进一步测序验证。将经测序验证的突变 TPH2 重组质粒提取后转化导入大肠埃希菌 BL21 (DE3),筛选得到阳性克隆后,将经固体 LB 培养基平板活化的单菌落接种于装有 100 mL 液体 LB 培养基的 500 mL 种子瓶内,添加 50 mg/L 的卡那霉素,37 °C、220 r/min 振荡培养 12 h;按 5% (体积分数,下同) 接种量转接装有 100 mL TB 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中,添加 50 mg/L 的卡那霉素,37 °C、220 r/min 进行培养, OD_{600} 为 0.6~0.8 时,补加 0.1 mmol/L IPTG 诱导表达色氨酸羟化酶 20 h^[17]。取诱导后菌液 4 000 r/min 离心 10 min,弃上清回收菌体。用 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 缓

冲溶液吹吸重悬,配制成终浓度为 100 mg/mL 的菌悬液。冰浴条件下超声破碎后 4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min,收集上清,SDS-PAGE 检测突变酶表达情况,并以野生型为参照(100%),用 ImageJ 对重组突变酶表达量进行相对定量分析。

1.2.2 5-HTP 发酵能力测定 将野生型 TPH2 及各突变体重组质粒转化导入大肠埃希菌 TRP-BH₄ 构建 5-HTP 细胞工厂,同样经菌落 PCR 筛选得到重组子后,将突变体菌种划线接种 LB 斜面 37 ℃ 活化培养 20 h,然后取 2 环菌苔接种于装液量 70 mL 的 500 mL 摇瓶种子培养基中,37 ℃、220 r/min 振荡培养至 OD_{600} 10~12。将培养好的种子按 10% 接种量接入装有 300 mL 培养基的 1 000 mL 罐体中,置于高通量生物反应摇床 37 ℃ 培养,初始通气量 27 L/h,转速为 220 r/min,通过自动流加氨水控制 pH 6.6~6.8。培养过程中,当溶氧降低至 30% 时交替提高通气量,维持溶氧在 30%~40%。当发酵液中葡萄糖质量浓度低于 8 g/L 时,补加质量浓度为 600 g/L 的葡萄糖溶液。当发酵液 OD_{600} 达到 30 左右时,加入 0.2 mmol/L 的 IPTG 进行诱导,并将培养温度降至 30 ℃,直至 48 h 发酵结束。发酵结束后,取发酵液并用 2 mol/L 的盐酸调节 pH 值至 3.5,10 000 r/min 离心 5 min 去除菌体,上清液再用 0.2 μm 滤膜过滤后用于 HPLC 检测 5-HTP 和色氨酸含量。5-HTP 检测采用高效液相色谱法,检测条件:色谱柱为 Hypersil ODS C18 250 mm×4.6 mm ID, 5 μm (Ther-

mo Fisher);检测器为 UV 检测器;流动相为 1.0% (pH 3.00±0.04),V 磷酸二氢钾:V 甲醇=92:8;流速为 1.0 mL/min;检测波长为 275 nm;进样量为 10 μL;柱温箱温度为 35 ℃;运行时间为 20 min。

2 结果与分析

2.1 突变酶的理性设计

TPH 催化 L-Trp 羟基化为 5-HTP,属于 BH₄ 依赖性芳香族氨基酸羟化酶(AAAHs)家族^[21-22],其中 TPH1 与 His272、His277、Glu317 和三个水分子形成共价连接^[23],晶体学和光谱学研究表明,在三元酶-氨基酸-BH₄ 复合物的形成过程中发生了许多结构变化^[24-25]。Song 等^[26]在 TPH1 与底物 L-Trp 的结合位点的 3 Å 范围内选择了 9 个残基(T265、P268、F313、E317、F318、G333、S337、E340 和 I366),将它们分别突变为丙氨酸,发现 S337A 的活性增加了 1.3 倍。利用 TPH2 催化结构域建模,选择设计了 9 个单位点或双位点突变:N185P、V195A/V197I、G200N、T217I、T316C、C357I、C396E、K398R/A399P、Y446R/F447Y 与色氨酸、BH₄ 和 Fe²⁺ 对接。图 1 是 PyMOL 呈现的利用 AutoDock Vina 进行野生 TPH2 及各突变体与色氨酸、BH₄ 和 Fe²⁺ 分子对接得到的四元复合物结构的最稳定姿态,可见一至两个位点的相应突变即可引起酶和底物色氨酸及辅酶 BH₄ 结合位点、氢键数目、结合能量等的显著改变,但酶的不稳定性指数(II)、脂肪族氨基酸指数、亲水性总平均值等特征参数变化不大(表 2)。

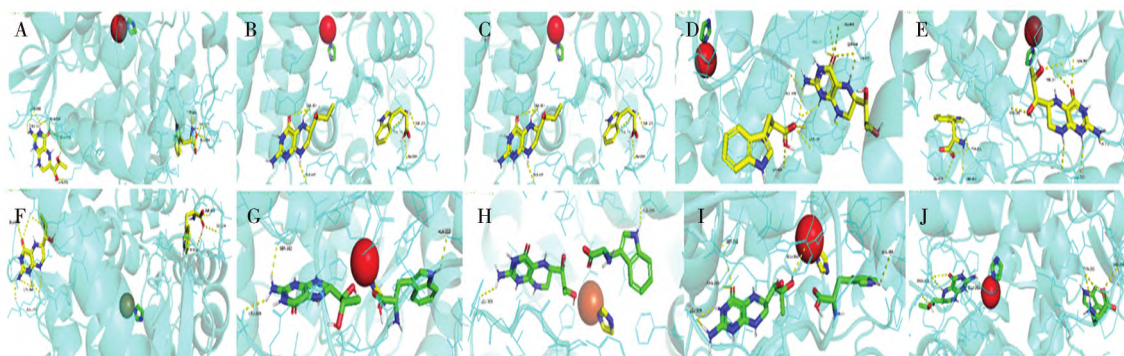


图 1 TPH2 及突变体与色氨酸、BH₄、Fe²⁺ 对接结果

Fig.1 Docking results of TPH2 and its mutants with tryptophan, BH₄ and Fe²⁺

A-J: WT、N185P、V195A/V197I、G200N、T217I、T316C、C357I、C396E、K398R/A399P、Y446R/F447Y

表 2 TPH2 野生酶(WT)及各突变体特征参数及四元对接复合物特征参数

Table 2 Characteristic parameters of TPH2 wild enzyme and mutants and quaternary docking complex

TPH2 类型	BH ₄ 结合位点	Trp 结合位点	结合能/ (Kcal · mol ⁻¹)	氢键数目 (BH ₄ /Trp)	不稳定 指数	脂肪族氨 基酸指数	亲水性 总平均值
WT	Thr311、Glu363、Gly379、 Ser382	Arg294、Gln337、Lys429、 Phe447	-11.490	4/4	51.15	74.80	-0.459
N185P	Glu238、Lys331、Lys368、 Gln369、Glu423	Tyr201、Gly204、Gln205	-9.863	8/4	51.55	74.80	-0.455
V195A/V197I	Gln337、Phe447	Tyr201、Gly204、Gln205	-10.020	3/3	51.29	74.61	-0.463
G200N	Glu338、Lys437、Arg441、 Ser444、Val445	Lys429、Arg433	-9.398	10/3	51.33	74.80	-0.465
T217I	Arg205、Glu211、Tyr212、 Asn256、Val257	Tyr201、Arg204、Gln205	-10.490	7/4	51.37	75.59	-0.448
T316C	Arg237、Lys368、 Glu370、Glu423	Tyr201、Gly204、Gln205	-10.080	8/3	51.15	74.80	-0.459
C357I	Leu309、Ser382	Ala355	-11.220	2/1	51.15	75.59	-0.455
C396E	Leu309	Ala355	-11.130	1/1	50.41	74.80	-0.471
K398R/A399P	Arg303、Leu309、Glu363、 Ser382	Ala355	-11.000	5/1	52.00	74.59	-0.467
Y446R/F447Y	Thr311、Glu363	Tyr201、Gly204	-11.650	4/3	51.15	74.80	-0.474

2.2 突变体的构建与筛选

提取 pET28/TPH2 重组质粒,利用设计的突变引物(表 1)和 Q5 定点突变试剂盒(NEB # E0554S)进行扩增、转化后,利用 pET-28a(+) 通用引物 T7 正向引物:5'-TAATACGACTCACTAT-AGGG-3'和 T7 反向引物:5'-TGCTAGTTATTGCT-CAGCGG-3'进行菌落 PCR 筛选鉴定重组子,结果如图 2 所示。所有突变体都得到了大小约 1.75 kb 的扩增条带,与预期大小一致。进一步测序验证,所有突变体都在设计的位点引入了预期突变(图 3)。

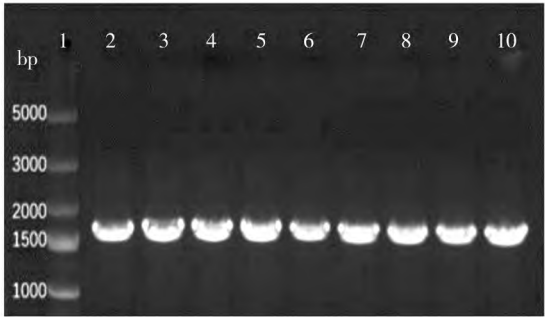
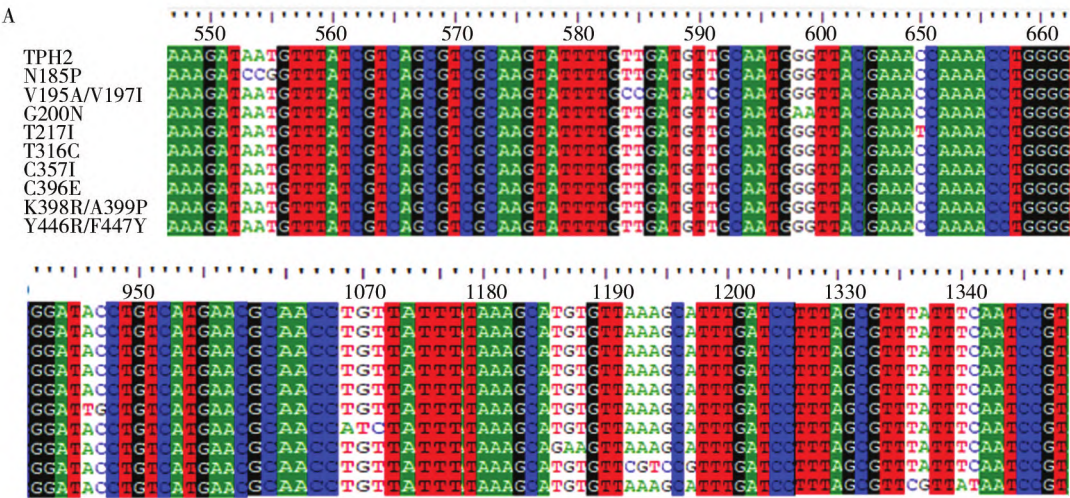


图 2 TPH2 突变体重重组子菌落 PCR 鉴定结果

Fig.2 Results of colony PCR identification of TPH2 mutant recombinants



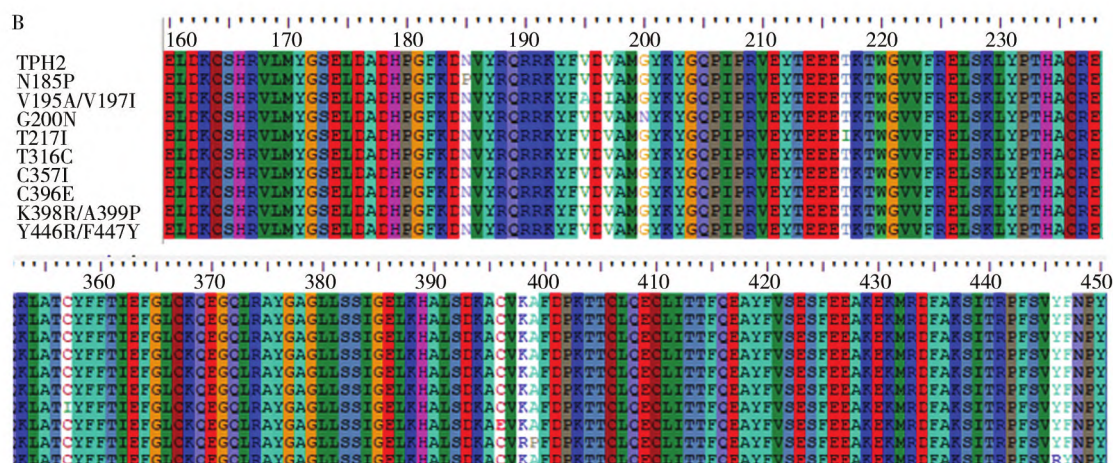


图3 TPH2 突变体重组子测序验证结果

Fig.3 Sequencing confirmation result of TPH2 mutant recombinants

序列位置编号自编码区第一个碱基 A (A) 或第一个氨基酸 M (B) 开始, 只显示突变位点及其附近序列。A: TPH2 野生型和突变体核酸序列比对结果; B: TPH2 野生型和突变体氨基酸序列比对结果

Sequence position number starting from the first base A in the coding area, only the mutation site and its nearby sequences are displayed. A: Comparison result of nucleotide sequences of wild and mutant types of TPH2; B: Comparison result of amino acid sequences of wild and mutant types of TPH2

2.3 TPH2 基因突变体表达情况

各 TPH2 基因突变体导入大肠埃希菌 BL21 (DE3) 后在 TB 培养基诱导表达情况见图 4, 所有突变体都实现了可溶性表达, 重组体全细胞裂解液中均检测到了预期约 58 kDa 的 TPH2 突变酶融合

蛋白 (图 4A), 比较而言突变体 K398R/A399P 可溶性表达量最高, 突变体 C396E 可溶性表达量最低, 其余突变体可溶性表达量差异不显著 ($P>0.05$, 图 4B), 但总体上 TPH2 各突变基因均能在高产色氨酸的大肠埃希菌 TRP-BH₄ 中高效表达。

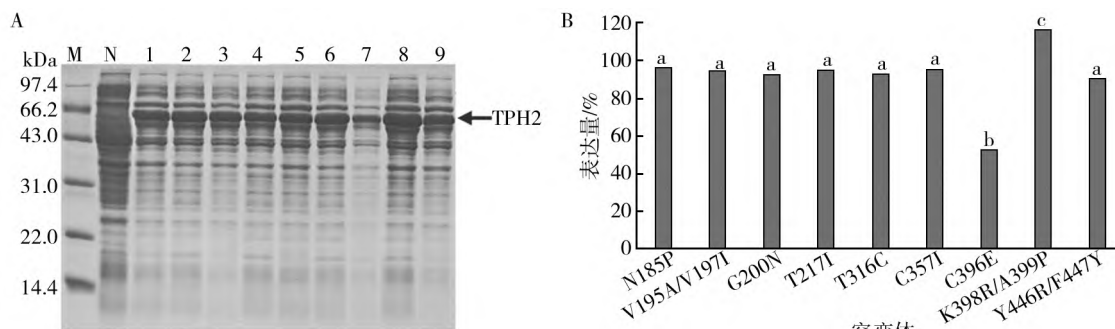


图4 重组 TPH2 突变体表达全细胞裂解液 SDS-PAGE 上清检测结果

Fig.4 SDS-PAGE detection results of whole cell lysate supernatant expressed by recombinant TPH2 mutants

A: SDS-PAGE 电泳图; B: TPH2 表达量定量比较 (不同字母表示显著差异, $P<0.05$); M: 蛋白质分子量标准; N: 未诱导的 *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a-TPH2; 1~9 泳道: 突变体 N185P、V195A/V197I、G200N、T217I、T316C、C357I、C396E、K398R/A399P 和 Y446R/F447Y 转化子

A: Electrophoretogram of SDS-PAGE; B: Quantitative comparison of expressed TPH2 (different letter indicate significant difference, $P<0.05$); M: Represents the molecular weight marker of protein; N: Represents the uninduced *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a-TPH2; 1-9: Represent the mutant transformants of N185P, V195A/V197I, G200N, T217I, T316C, C357, C396E, K398R/A399P and Y446R/F447Y, respectively

2.4 突变酶构建的 5-HTP 细胞工厂发酵性能

根据 HPLC 测定、计算得到各突变体导入

E. coli TRP-BH₄ 所构建的各细胞工厂的 5-HTP 产量、5-HTP/Trp 值如图 5 所示。突变酶 5-HTP

产量较野生酶均有提高,说明本次理性设计是成功的。突变酶 V195A/V197I 构建的细胞工厂不仅 5-HTP 发酵产量最高(16.17 g/L),相对野生酶产量提高了 54%,而且发酵产物中 5-HTP/Trp 比值大幅提高,由野生酶的 1.08 提高至 3.21,即发酵液中色氨酸残留量大幅降低(9.72 g/L vs. 5.04 g/L),这非常有利于后续从发酵液中提取、精制产物 5-HTP。值得注意的是,与相应突变体在 *E. coli* BL21(DE3)表达后采用游离细胞进行的生物转化相比,相应突变基因导入 *E. coli* TRP-BH₄ 构建的细胞工厂合成 5-HTP 的能力更强,且产物中色氨酸含量占比更低^[17]。

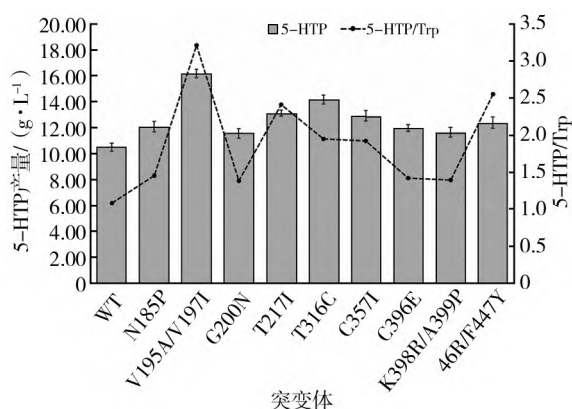


图 5 构建的不同细胞工厂的 5-HTP 发酵产量及发酵液中 5-HTP 和色氨酸含量比

Fig.5 The fermentation yield of 5-HTP and the content ratio of 5-HTP to tryptophan in fermentation broth of different constructed cell factories

3 讨论

突变酶 N185P、T217I、V195A/V197I 和 T316C 与色氨酸结合位点均为 Tyr201、Arg204 和 Gln205 3 个氨基酸,但 N185P、T217I 与色氨酸间均形成 4 个氢键,V195A/V197I 和 T316C 与色氨酸间均形成 3 个氢键,后两者的 5-HTP 产量在所有突变体中最高,说明适当降低底物色氨酸和 TPH2 的结合能力至 3 个氢键,提高酶-底物的结合能,有助于提高酶-色氨酸-BH₄-Fe²⁺ 四元复合物的柔性,从而提高 TPH2 的催化效率;类似地,TPH2 与辅酶 BH₄ 结合的氢键数增加同样使得四元复合物刚性太强,从而降低了 TPH2 的催化效率。分析原因,本研究所用 TPH2 源自人,在人和哺乳动物体内主要在大脑神经元中表达,而该部

位色氨酸浓度通常很低^[27-28],因而进化出很强的与底物色氨酸及辅酶 BH₄ 结合的能力,但这样的复合物结构刚性较强,使得 TPH2 活性不高,在体内合成褪黑素过程中形成了典型的限速步骤^[29]。同理,突变酶 C357I、C396E、K398R/A399P 与色氨酸结合位点均只有 Ala355,且仅形成 1 个氢键连接,使得四元复合物柔性太强,因而催化效率相对也较低。在所有突变体中,突变酶 C396E 可溶性表达量与其他突变酶及野生酶相比显著降低,但其 5-HTP 产量较野生酶也有明显提高,分析与其不稳定指数在所有酶中最低,稳定性最高有关。

徐庆阳等^[30]利用大肠埃希菌 HTP10 发酵,在发酵中期产酸阶段减少通风量,降低溶氧,流加柠檬酸,保证 BH₄ 合成过程还原力充足,在底糖消耗尽后降低补糖速率,减少色氨酸累积,使得 EMP 途径受到抑制,而 HMP 途径增强,提高了 5-HTP 产量,并减少了中间产物色氨酸积累,解决了 BH₄ 在生物发酵过程中被氧化消耗,合成过程还原力不足以及色氨酸过量累积影响 5-HTP 产量的问题,使 5-HTP 产量由 1.75 g/L 提高至 1.93 g/L,而色氨酸积累由 2.81 g/L 降至 1.82 g/L;他们还通过在原有 5-HTP 工程菌株的基础上,异源表达活性高、毒性低的色氨酸羟化酶突变体,构建了更加高效的色氨酸羟化途径,结合构建 NAD(P)H 再生途径,使 5-HTP 产量达 6.3 g/L,较起始工程菌产量提高了 236.9%,且 L-色氨酸含量降低了 88.4%^[31]。与本研究最为接近的是 Song 等^[26]通过 TPH1 的理性设计,使 5-HTP 产量提高了 2.06 倍,但最终产量却仅为 0.91 g/L。除本团队的专利^[17]报道了 TPH2 突变体可以提高游离细胞转化色氨酸为 5-HTP 效率外,尚未见到利用 TPH2 突变体以大肠埃希菌细胞为底盘构建成功 5-HTP 细胞工厂的报道,本研究利用专利中设计的突变酶以大肠埃希菌为底盘细胞,在前期工作基础上构建了系列细胞工厂,得到了目前 5-HTP 生产性能最高的菌种,1 L 补料摇瓶发酵 48 h,5-HTP 产量高达 16.17 g/L。

酶的理性设计是提高 TPH2 酶活,突破 5-HTP 合成限速步骤,提高 5-HTP 发酵产量的有效途径。TPH2 和底物色氨酸、辅酶 BH₄ 间氢键连接太多或太少都不利于其催化活性的发挥,实验条件下突变酶 V195A/V197I 与底物色氨酸、辅酶 BH₄ 间氢键

数目均为 3 个,细胞内催化活性最高,以此为基础构建的细胞工厂发酵 48 h 获得了目前由葡萄糖起始的 5-HTP 发酵最高产量 16.17 g/L。

参考文献:

- [1] Maffei ME. 5-hydroxytryptophan (5-HTP): Natural occurrence, analysis, biosynthesis, biotechnology, physiology and toxicology[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22 (181):181.
- [2] Zhang H, Zhao H, Yang X, et al. 5-Hydroxytryptophan, a precursor for serotonin synthesis, reduces seizure-induced respiratory arrest[J]. Epilepsia, 2016, 57(8):1228-1235.
- [3] Halford JC, Harrold JA, Boyland EJ, et al. Serotonergic drugs: Effects on appetite expression and use for the treatment of obesity[J]. Drugs, 2007, 67(1): 27-55.
- [4] Hinz M, Stein A, Uncini T. 5-HTP efficacy and contraindications[J]. Neuropsychiatric Disease and Treatment, 2012, 8: 323-328.
- [5] Hawkins M. A 10-year history of using of 5-Hydroxytryptophan for severe insomnia in a 15-year-old with autism, seizures, and sleep apnea; cause for concern? [J]. Sleep Medicine, 2019, 64(S1): S148.
- [6] Aaldijk E, Vermeiren Y. The role of serotonin within the microbiota-gut-brain axis in the development of Alzheimer's disease: A narrative review[J]. Ageing Research Reviews, 2022, 75: 1568-1637.
- [7] Turner EH, Loftis JM, Blackwell AD. Serotonin a la carte: Supplementation with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan[J]. Pharmacology and Therapeutics, 2006, 109(3): 325-338.
- [8] Lin Y, Sun X, Yuan Q, et al. Engineering bacterial phenylalanine 4-hydroxylase for microbial synthesis of human neurotransmitter precursor 5-hydroxytryptophan[J]. ACS Synthetic Biology, 2014, 3(7): 497-505.
- [9] 孙敬方, 赵云现. 一种生产 5-羟色氨酸的方法; CN107267417B[P]. 2018-03-23.
- [10] 孙敬方, 赵云现. 一种生产 5-羟色氨酸的方法; CN107164282B[P]. 2018-03-23.
- [11] Zhang Z, Yu Z, Wang J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of L-5-hydroxytryptophan from glucose[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 1-15.
- [12] Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease[J]. Cell Host Microbe, 2018, 23(6): 716-724.
- [13] Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, et al. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform[J]. Science, 2003, 299(5603): 76.
- [14] Wang HJ, Liu WQ, Feng S, et al. Metabolic pathway engineering for high-level production of 5-hydroxytryptophan in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2018, 4(8): 279-287.
- [15] Xu D, Fang M, Wang H, et al. Enhanced production of 5-hydroxytryptophan through the regulation of L-tryptophan biosynthetic pathway[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104: 2481-2488.
- [16] Wang Y, Chen X, Chen Q, et al. Construction of cell factory capable of efficiently converting L-tryptophan into 5-hydroxytryptamine[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 47.
- [17] 赵云现, 杨志彬, 李爱涛, 等. 一种新的色氨酸羟化酶突变体及其应用; CN 112522222 B[P]. 2021-12-07.
- [18] Sumbalova L, Stourac J, Martinek T, et al. HotSpot Wizard 3.0: Web server for automated design of mutations and smart libraries based on sequence input information[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): W356-W362.
- [19] Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. Journal of Computational Chemistry, 2010, 31(2): 455-461.
- [20] Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(S2): SW407-SW410.
- [21] Roberts KM, Fitzpatrick PF. Mechanisms of tryptophan and tyrosine hydroxylase[J]. IUBMB Life, 2013, 65(4): 350-357.
- [22] Fitzpatrick PF. Mechanism of aromatic amino acid hydroxylation[J]. Biochemistry, 2003, 42(48): 14083-14091.
- [23] Koehn KD, Emerson JP, Que L. The 2-His-1-carboxylate facial triad: A versatile platform for dioxygen activation by mononuclear non-heme iron(II) enzymes[J]. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2005, 10(2): 87-93.
- [24] Andersen OA, Flatmark T, Hough E. High resolution crystal structures of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase in its catalytically active Fe(II) form and binary complex with tetrahydrobiopterin[J]. Journal of Molecular Biology, 2001, 314(2): 279-291.
- [25] Wang L, Erlandsen H, Haavik J, et al. Three-dimensional structure of human tryptophan hydroxylase and its implications for the biosynthesis of the neurotransmitters serotonin and melatonin[J]. Biochemistry, 2002, 41(42): 12569-12574.
- [26] Song F, Gu T, Zhang L, et al. Rational design of tryptophan hydroxylase 1 for improving 5-hydroxytryptophan production[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2023, 165: 110198.
- [27] Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, et al. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform[J]. Science, 2003, 299(5603): 76.
- [28] Matthes S, Bader M. Peripheral serotonin synthesis as a new drug target[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2018, 39(6): 495-506.
- [29] Xia JD, Chen J, Yang BB, et al. Differences in sympathetic nervous system activity and NMDA receptor levels within the hypothalamic paraventricular nucleus in rats with differential ejaculatory behavior[J]. Asian Journal of Andrology, 2018, 20(4): 355-359.
- [30] 徐庆阳, 余子辰, 张震. 一种提高 5-羟色氨酸产量的方法; CN113373103A[P]. 2021-09-10.
- [31] 徐庆阳, 余子辰, 张震. 一种生产 5-羟色氨酸的基因工程菌及其构建方法与应用; CN115948311A[P]. 2023-04-11.