

# 海藻糖代谢途径相关基因及生物工程

任媛媛 刘景芳 戴秀玉\* 向 华\*

(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 100080)

## Genes Involved in Biosynthesis and Metabolism of Trehalose and Their Use in Biotechnology

Ren Yuanyuan Liu Jingfang Dai Xiuyi\* Xiang Hua\*

(State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

关键词 海藻糖 基因 生物合成 生物工程

中图分类号 Q591 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2003)06-0821-05

海藻糖(Trehalose)是一种由两个葡萄糖分子通过 $\alpha$ -1,1糖苷键连接的非还原性双糖。最早的记录是在19世纪初期作为黑麦的麦角菌的一种成分而被描述,后来发现海藻糖广泛存在于微生物、动物和植物体内,特别是在那些能抗脱水作用的生物中起着重要作用。这些特殊生物具有在脱水条件下存活多年的性质,包括所谓的“复苏植物”(Selaginella lepidophylla)、某些咸水虾、线虫及面包酵母等。当它们体内99%的水分被去掉之后,仍保持着能在获水后迅速复活的能力<sup>[1]</sup>。研究表明,海藻糖对于生物抗逆具有重要的保护作用。海藻糖的应用研究因此得到了人们的广泛关注和重视,目前海藻糖已被用作酶、其它蛋白、生物制品甚至移植器官的保护剂。海藻糖作为生物体对抗环境胁迫的重要应激保护物质,在不同生物中存在多种合成和分解代谢途径,相关基因已相继被克隆和分析。海藻糖合成、分解及其调控是生物抗逆的重要机制,其相关基因的研究也是海藻糖生物工程的重要基础。

### 1 海藻糖——重要的生物抗逆保护物质

生物体内的海藻糖最初被认为只是作为一种碳源而被储存,后来发现海藻糖往往是在环境胁迫的条件下产生,含量可随环境条件变化而变化,是一种应激代谢物。如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)在高温条件或稳定期生长时可在其体内积累海藻糖,含量可达其细胞干重的10%~15%,而在实验室标准生长条件下其体内却没有或很少积累海藻糖<sup>[1,2]</sup>。研究表明,海藻糖具有在胁迫条件下防止酵母体内蛋白质聚集和帮助蛋白质正确折叠的功能,这些胁迫条件包括热激、冷冻、解冻、脱水、高压及氧化作用等。在另一些生物体内海藻糖也起着类似的作用,如海藻糖的积累使昆虫有了抵御霜冻的能力,对于大肠杆菌(*Escherichia coli*)而言则可以对抗环境渗透压的变化<sup>[3]</sup>。在白假丝酵母(*Candida albicans*)中发现,海藻糖还能提高其抵御过氧化物毒害的能力<sup>[4]</sup>。最新研究表明,6-磷酸海藻糖合成酶(Trehalose-6-phosphate synthase)的过量表达可以增强黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)耐受缺氧胁迫的能力,并在果蝇发育中起重要作用<sup>[5]</sup>。在拟南芥(*Arabidopsis*)中6-磷酸海藻糖合成酶对其胚芽的成熟同样具有不可缺少的作用。

基金项目 国家自然科学基金(30170015);中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-SW-112)

\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-62656916; E-mail: daixy@sun.im.ac.cn, xiangh@sun.im.ac.cn

作者简介 任媛媛(1977-),女,山东人,在读硕士研究生,主要从事分子生物学研究。E-mail: 197723@sohu.com

收稿日期 2003-02-12, 修回日期 2003-06-04

用<sup>[6]</sup>。更有科学家研究发现海藻糖可以提高培养过程中人体纤维原细胞的耐脱水性。上述研究结果表明,海藻糖是一种在生物界广泛存在的具有生物抗逆保护作用的重要物质。

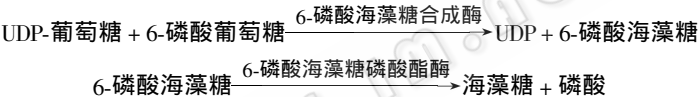
尽管海藻糖在不同环境胁迫下对生物的保护机制尚不完全清楚,但可以肯定的是这些重要的生理功能是与独特的理化性质分不开的。海藻糖分子中的  $\alpha$ -1,1 糖苷键的能量非常低(约 1 kcal/mol),只有另一种非还原性双糖——蔗糖糖苷键的 1/27,因此海藻糖是一种结构稳定的非还原性双糖,自身不与氨基酸或蛋白质等发生作用,具有明显的化学惰性和极强的稳定性<sup>[7]</sup>。海藻糖作为生物应激物还在于其合成分解是可控的,在胁迫条件诱导下,海藻糖合成途径启动,当环境恢复正常时,海藻糖通常又可作为碳源被分解代谢掉。

2 海藻糖生物合成途径及其相关基因

在不同生物中,海藻糖的生物合成途径并不完全相同,目前至少已发现 3 种途径。可以相信,随着研究的深入,新的海藻糖合成途径还有可能在其它物种中发现。

2.1 OtsA-OtsB 途径

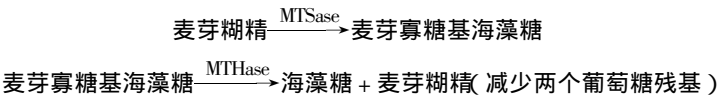
所谓 OtsA-OtsB 途径,是指由 6-磷酸海藻糖合成酶催化尿苷二磷酸(Uridine Diphosphate, UDP)葡萄糖和 6-磷酸葡萄糖合成 6-磷酸海藻糖(Trehalose-6-phosphate, Tre6P),再在 6-磷酸海藻糖磷酸酯酶(Trehalose-6-phosphate phosphatase)作用下生成海藻糖的生物学过程,由于在 *E. coli* 中催化上述反应的两个酶分别由 *OtsA* 和 *OtsB* 基因编码而得名<sup>[3]</sup>。反应式如下:



在酵母中海藻糖合成也采用该途径,编码上述两个酶的基因分别为 *TPS1*(以前还有称做 *GGS1*, *CIF1*, *BYP1*, *FDP1*, *GLC6*, *TSS1* 等)和 *TPS2*(以前被称做 *HOG2* 或 *PFK3*)<sup>[8]</sup>。事实上,这是大多数生物所采用的海藻糖合成途径。在酿酒酵母中,上述海藻糖合成相关酶可形成多酶复合体。研究者发现,这一复合物至少包括 4 种蛋白(*TPS1*(56 kD), *TPS2*(100 kD), *TSL1* 和 *TPS3*(120 kD)),其中 *TSL1* 和 *TPS3* 同源性很高,可能对该多酶复合物具有活性调节或结构稳定的作用。*TPS1* 除直接参与海藻糖合成外,还可能参与对糖酵解途径的调节。原因之一是 *TPS1* 的产物 6-磷酸海藻糖具有抑制己糖激酶的作用<sup>[9]</sup>。这一结果暗示在生物体遭遇环境胁迫而启动海藻糖途径后,葡萄糖进入糖酵解的途径也可被有效限制。

2.2 TreY-TreZ 途径

海藻糖生物合成的 TreY-TreZ 途径是由麦芽寡糖基海藻糖合成酶(Maltooligosyltrehalose synthase, MT-Sase, *TreY* 基因编码)和麦芽寡糖基海藻糖水解脱酶(Maltooligosyltrehalose trehalohydrolase, MTHase, *TreZ* 基因编码)催化完成。反应的主要过程是麦芽糊精(Maltodextrin)末端两个葡萄糖间的  $\alpha$ -1,4 糖苷键在 MT-Sase 的催化下转变成  $\alpha$ -1,1 糖苷键,成为麦芽寡糖基海藻糖(Maltooligosyltrehalose),然后在 MTHase 的催化下水解下一个海藻糖,而原来的麦芽糊精则转变为减少了两个葡萄糖基的新寡糖,并可作为新的底物进行下一轮反应。反应式为:



目前,这一海藻糖合成途径已在节杆菌(*Arthrobacter* sp. strain Q36)<sup>[10]</sup>、根瘤菌(*Rhizobium* sp. strain M-11)<sup>[11]</sup>、微黄短杆菌(*Brevibacterium helvolum*)<sup>[12]</sup>、硫磺矿硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus* KMI)<sup>[13]</sup>及结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)<sup>[2]</sup>中被证实。其中,嗜热古细菌硫磺矿硫化叶菌 KMI 中发现的海藻糖合成相关酶为特殊的糖基转移酶(Glycosyltransferase)和  $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -amylase),它们具有在高温下将可溶性淀粉转化为海藻糖的活性,并具有很高的热稳定性,但其反应原理与 MTSase 和 MTHase 是一致的。

这类可以将可溶性淀粉转化为海藻糖的酶类已应用于海藻糖的工业化生产。

2.3 TreS 途径

TreS 途径则是由 *TreS* 基因所编码的海藻糖合成酶所催化完成的,作用的底物是麦芽糖( Maltose ),反应将  $\alpha, \alpha\text{-}1, 4$  糖苷键连接的麦芽糖转化为  $\alpha, \alpha\text{-}1, 1$  糖苷键连接的海藻糖。该途径是在脂肪杆菌( *Pimelobacter* sp. R48 )和水生栖热菌( *Thermus aquaticus* )两株菌中发现的<sup>[14, 15]</sup>。TreS 作用机制与 MTSase 类似,也是分子内的转糖基化作用。该反应同时也是上述 3 个海藻糖合成途径中唯一一个具可逆反应的途径,即该酶也可以将海藻糖转化为麦芽糖。在结核分枝杆菌中,该酶催化麦芽糖转化为海藻糖的速率是其逆反应的 2.5 倍<sup>[21]</sup>。特别值得指出的是,结核分枝杆菌中同时存在上述 3 条海藻糖合成途径,海藻糖因此在其细胞内长期存在,表明海藻糖对其行使正常生理功能同样具有重要影响,如该菌中存在着二分枝酰海藻糖及单分枝酰海藻糖,它们与结核菌的毒性存在着密切的关系<sup>[21]</sup>。

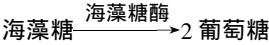
2.4 其它途径

除了上述 3 种主要的海藻糖生物合成途径外,自然界还可能存在着其它未知的途径。一个例子是日本学者已从担子菌灰树花( *Grifola frondosa* )中发现了一种新的海藻糖合成酶( Trehalose synthase, TSase ),该酶可特异利用 D-葡萄糖与 1-磷酸葡萄糖合成海藻糖<sup>[16]</sup>。TSase 实际上也是一种海藻糖磷酸化酶( Trehalose phosphorylase, TPase ),因为它也可以催化上述反应的逆反应,即通过磷酸化作用分解海藻糖。尽管 TSase 途径及其生理功能尚有待研究,但该酶已显示了一定的工业应用前景。如淀粉或蔗糖在葡萄糖基磷酸化酶( Glucanphosphorylase )的作用下可生成 1-磷酸葡萄糖,然后在 TSase 催化作用下与葡萄糖作用生成海藻糖和正磷酸盐,利用这一反应可实现以淀粉或蔗糖等廉价底物生产海藻糖的目的。

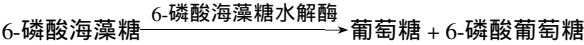
3 海藻糖分解代谢途径及其相关基因

与海藻糖合成途径多样化相类似,海藻糖分解代谢在不同生物中也存在着几种不同的途径。海藻糖分解代谢按反应类型可归纳为 4 类<sup>[17, 18]</sup>:其一,海藻糖在海藻糖酶( Trehalase, THase )作用下直接分解为两分子葡萄糖;其二,海藻糖经由 6-磷酸海藻糖,在 6-磷酸海藻糖水解酶( Trehalose-6-phosphate hydrolase, TPHase )作用下分解为葡萄糖与 6-磷酸葡萄糖;其三,海藻糖经由 6-磷酸海藻糖,在 6-磷酸海藻糖磷酸化酶( Trehalose-6-phosphate phosphorylase, TrePP )作用下生成 6-磷酸葡萄糖和 1-磷酸葡萄糖,1-磷酸葡萄糖再经磷酸葡萄糖变位酶( Phosphoglucumutase )转化成 6-磷酸葡萄糖而进入糖代谢途径;其四,海藻糖在海藻糖磷酸化酶作用下裂解为葡萄糖与 1-磷酸葡萄糖。这四条途径反应式分别如下所示:

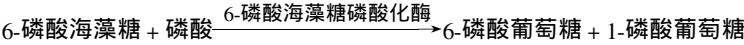
途径一:



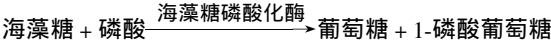
途径二:



途径三:



途径四:



以大肠杆菌为代表的革兰氏阴性菌主要采用上述第一、二条途径。在大肠杆菌中,海藻糖酶由 *TreA* 基因编码<sup>[19]</sup>,主要是在细胞壁周质中分解外来的海藻糖并作为碳源利用。6-磷酸海藻糖水解酶则由 *TreC* 基因编码,在低渗透压的条件下,大肠杆菌中海藻糖以 6-磷酸海藻糖的形式被 6-磷酸海藻糖水解酶分解。上述第一、第三和第四条途径则已在革兰氏阳性细菌、真菌或藻类中发现<sup>[20~22]</sup>。值得一提的是在酵母存在两类海藻糖水解酶,即中性海藻糖水解酶( Neutral trehalase, NTH, 由 *NTH1* 和 *NTH2* 基因编码 )

和酸性水解酶(Acidic trehalase, ATH, 由 *ATH1* 基因编码)<sup>[17]</sup>, NTH1 存在于胞质中, 受磷酸化作用所调控, 直接对生理刺激作出反应, 推测可能参与环境胁迫解除后海藻糖的迅速分解和利用。而 ATH1 存在于液泡(Vacuole)中, 与 NTH1 不具同源性, 可能不参与海藻糖的生理应激, 受葡萄糖抑制, 其生理功能还不清楚。

#### 4 海藻糖的生物工程生产

海藻糖不仅是生物体内重要的抗逆保护物质, 在体外对生物分子也具有有效的保护作用。海藻糖已成功用于保藏酶、疫苗等容易失活的生物大分子, 近来还被用来保藏人淋巴细胞、红细胞、肺切片及某些用来进行器官移植的活器官, 如在胰岛保存液中添加海藻糖后, 可使被保存胰岛的复活率由原来的 58% 提高到 92%<sup>[23]</sup>。海藻糖最近已通过欧州标准及美国食品药品监督管理局(FDA)认证。因此作为安全有效的添加剂或保护剂, 其应用领域还将不断拓宽到食品、医药及化妆品等行业中, 海藻糖生物工程及其工业化生产将是一个很有前景的产业。

海藻糖合成代谢途径相关基因的研究为海藻糖生物工程生产提供了思路。如从节杆菌 Q36 中分离出 MTSase 和 MTHase, 以预处理过的淀粉为底物, 在 40℃ 下进行酶促反应, 可以使海藻糖转化率达到 66%<sup>[24]</sup>。利用高温菌硫磺矿硫化叶菌的 MTSase 和 MTHase 酶使海藻糖转化率提高到 83%<sup>[13]</sup>。近有科学家利用基因工程技术将催化两个连续反应的酶融合到一起形成双功能融合酶, 实验证明新酶不仅可增加酶与底物的亲和力, 而且也大大简化了提取纯化的步骤, 这已在海藻糖生物工程生产中得到应用。研究者将微黄短杆菌中 MTSase 和 MTHase 基因融合, 表达产生了新酶 MTSH。可能因为融合酶中前一个反应的产物更容易接近后一反应的酶活性位点, 反应效率明显提高<sup>[1, 12]</sup>。另外, 通过基因工程表达了灰树花的海藻糖合成酶, 它可利用  $\alpha$ -D-葡萄糖-1-磷酸和 D-葡萄糖合成海藻糖。这种合成酶与蔗糖磷酸化酶共同作用已实现从蔗糖生产海藻糖, 反应混合液中海藻糖的产量(摩尔比)最高可达 90%<sup>[1, 16]</sup>。

#### 5 结束语

海藻糖代谢途径相关基因及生物工程的研究具有重要的理论和实践意义。在理论研究方面, 海藻糖代谢网络及其调控的研究对于揭示生物抗逆机制及对极端环境的适应机制具有重要价值。在应用方面, 相关基因的克隆及生物工程应用已显示出明显的经济效益。但目前尚缺乏在基因组水平系统研究海藻糖代谢网络与其它糖代谢网络的关系以及在适应极端环境中的作用。因此本实验室以我国已自主完成全序列测定的嗜热嗜热菌(*Thermoanaerobacter tengcongensis*)基因组信息为基础<sup>[25]</sup>, 在功能基因组水平上开始了该极端嗜热菌海藻糖代谢网络全蛋白互作组的研究, 以期在功能基因组水平, 系统揭示海藻糖这一独特双糖在极端微生物中的生理功能及其在分子水平上的作用机制, 并为海藻糖生物工程相关产业提供新的候选基因。

#### 参 考 文 献

- [1] Schiraldi C, Di Lernia I, De Rosa M. Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends Biotechnol*, 2002, **20**(10): 421 ~ 425.
- [2] De Smet K A, Weston A, Brown I N, et al. Three pathways for Trehalose biosynthesis in mycobacteria. *Microbiology*, 2002, **146**: 199 ~ 208.
- [3] Kaasen I, Falkenberg P, Styrvold O B, et al. Molecular cloning and physical mapping of the *otsBA* genes, which encode the osmoregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli*: evidence that transcription is activated by KatF (AppR). *J Bacteriol*, 1992, **174**(3): 889 ~ 898.
- [4] Alvarez-Peral F J, Zaragoza O, Pedreno Y, et al. Protective role of trehalose during severe oxidative stress caused by hydrogen peroxide and the adaptive oxidative stress response in *Candida albicans*. *Microbiologia*, 2002, **148**: 2599 ~ 2606.

- [ 5 ] Chen Q , Ma E , Behar K L , *et al.* Role of trehalose phosphate synthase in *Anoxia tolerance* and Development in *Drosophila melanogaster* . *J Biol Chem* , 2002 , **277**( 5 ) : 3274 ~ 3279 .
- [ 6 ] Eastmond P J , van Dijken A J , Spielman M , *et al.* Trehalose-6-phosphate synthase 1 , which catalyses the first step in trehalose synthesis , is essential for *Arabidopsis* embryo maturation . *Plant J* 2002 , **29**( 2 ) : 225 ~ 235 .
- [ 7 ] Paiva C L , Panek A D . Biotechnological applications of the disaccharide trehalose . *Biotechnol Annu Rev* , 1996 , **2** : 293 ~ 314 .
- [ 8 ] Bell W , Sun W , Hohmann S , *et al.* Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex . *J Biol Chem* , 1998 , **273**( 50 ) : 33311 ~ 33319 .
- [ 9 ] van Vaec C , Wera S , van Dijk P , *et al.* Analysis and modification of trehalose 6-phosphate levels in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* with the use of *Bacillus subtilis* phosphotrehalase . *Biochem J* , 2001 , **353** : 157 ~ 162 .
- [ 10 ] Maruta K , Hattori K , Nakada T , *et al.* Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Arthrobacter* sp. Q36 . *Biochim Biophys Acta* , 1996 , **1289**( 1 ) : 10 ~ 13 .
- [ 11 ] Maruta K , Hattori K , Nakada T , *et al.* Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Rhizobium* sp. M-11 . *Biosci Biotech Biochem* , 1996 , **60**( 4 ) : 717 ~ 720 .
- [ 12 ] Kim Y H , Kwon T K , Park S , *et al.* Trehalose synthesis by sequential reactions of recombinant maltotoligosyltrehalose synthase and maltotoligosyltrehalose trehalohydrolase from *Brevibacterium helvolum* . *Appl Environ Microbiol* , 2000 , **11** : 4620 ~ 4624 .
- [ 13 ] Kato M , Miura Y , Kettoku M , *et al.* Purification and characterization of new trehalose-producing enzymes isolated from the hyperthermophilic archae , *sulfolobus solfataricus* KM1 . *Biosci Biotechnol Biochem* , 1996 , **60**( 3 ) : 546 ~ 550 .
- [ 14 ] Tsusaki K , Nishimoto T , Nakada T , *et al.* Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Pimelobacter* sp. R48 . *Biochim Biophys Acta* , 1996 , **1290**( 1 ) : 1 ~ 3 .
- [ 15 ] Tsusaki K , Nishimoto T , Nakada T , *et al.* Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Thermus aquaticus* ATCC33923 . *Biochim Biophys Acta* , 1997 , **1334**( 1 ) : 28 ~ 32 .
- [ 16 ] Saito K , Yamazaki H , Ohnishi Y , *et al.* Production of trehalose synthase from a basidiomycete , *Grifola frondosa* , in *Escherichia coli* . *Appl Microbiol Biotechnol* , 1998 , **50**( 2 ) : 193 ~ 198 .
- [ 17 ] Arguelles J C . Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts : a comparative analysis . *Arch Microbiol* , 2000 , **174**( 4 ) : 217 ~ 224 .
- [ 18 ] Andersson U , Levander F , Radstrom P . Trehalose-6-phosphate phosphorylase is part of a novel metabolic pathway for trehalose utilization in *Lactococcus lactis* . *J Biol Chem* , 2001 , **276**( 46 ) : 42707 ~ 41713 .
- [ 19 ] Boos W , Ehmann U , Bremer E , *et al.* Trehalase of *Escherichia coli* . Mapping and cloning of its structural gene and identification of the enzyme as a periplasmic protein induced under high osmolarity growth conditions . *J Biol Chem* , 1987 , **262**( 27 ) : 13212 ~ 13218 .
- [ 20 ] Eis C , Nidetzky B . Characterization of trehalose phosphorylase from *Schizophyllum commune* . *Biochem J* , 1999 , **341**( Pt 2 ) : 385 ~ 393 .
- [ 21 ] Gotsche S , Dahl M K . Purification and characterization of the phospho-alpha( 1 , 1 ) glucosidase ( TreA ) of *Bacillus subtilis* 168 . *J Bacteriol* , 1995 , **177**( 10 ) : 2721 ~ 2726 .
- [ 22 ] Aisaka K , Masuda T , Chikamune T , *et al.* Purification and characterization of trehalose phosphorylase from *Catellatospora ferruginea* . *Biosci Biotechnol Biochem* , 1998 , **62**( 4 ) : 782 ~ 787 .
- [ 23 ] Beattie G M , Crowe J H , Lopez A D , *et al.* Trehalose : a cryoprotectant that enhances recovery and preserves function of human pancreatic islets after long-term storage . *Diabetes* , 1997 , **46**( 3 ) : 519 ~ 523 .
- [ 24 ] Maruta K , Nakada T , Kubota M , *et al.* Formation of trehalose from maltotoligosaccharides by a novel enzymatic system . *Biosci Biotechnol Biochem* , 1995 , **59**( 10 ) : 1829 ~ 1834 .
- [ 25 ] Bao Q Y , Tian Y Q , Li W , *et al.* The complete sequence of the *T. tengcongensis* genome . *Genome Research* , 2002 , **12** : 689 ~ 700 .