

真养产碱杆菌 112R₄ 酰亚胺酶基因的克隆、 序列分析及其在大肠杆菌中的表达*

王 宇 张英姿 丁久元 刘阳剑 王 绛 余志华**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 筛选到一株具海因水解活力的微生物,经鉴定后命名为真养产碱杆菌 112R₄。该菌能水解海因、二氢尿嘧啶和琥珀酰亚胺,且对琥珀酰亚胺活力最高,但不水解 5-单取代海因和 5,5'-双取代海因,因而被确定为含有酰亚胺酶。真养产碱杆菌 112R₄ 能在以琥珀酰亚胺为唯一碳、氮源的培养基上生长,表明该菌中存在琥珀酰亚胺完整的转化途径。从 112R₄ 基因组 DNA 出发,用鸟枪法克隆了一个 6kb 的与环酰亚胺水解相关的 DNA 片段,进一步亚克隆得到了带酰亚胺酶基因的 2kb 的 DNA 片段,并进行了序列测定。缺失分析确定了一个 876bp 的 ORF 为真养产碱杆菌 112R₄ 的酰亚胺酶基因,推测编码一个 291 个氨基酸的多肽,这是第一次报道微生物酰亚胺酶的核酸和蛋白序列。推测的氨基酸序列在蛋白数据库中进行了比较,结果表明,酰亚胺酶与已知的环酰胺酶没有明显的同源性,也不属于氨酰水解酶蛋白超家族,因而被分类为一种新的环酰胺酶。真养产碱杆菌 112R₄ 的酰亚胺酶与芽生杆菌 A17p-4 的酰亚胺酶 N 端的 20 个氨基酸有较高的同源性,一致性为 60%,与多糖脱乙酰酶保守序列也部分同源,一致性为 14%。带有酰亚胺酶基因的重组质粒在大肠杆菌中得到表达,在 *lac* 启动子控制下,使用 1mmol/L IPTG 诱导 5h,酰亚胺酶活力达到 3200U/L,为供体菌真养产碱杆菌 112R₄ 的 7 倍。

关键词: 酰亚胺酶,基因克隆,序列分析,基因表达,真养产碱杆菌

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)02-0153-10

海因是一种环状酰脲类化合物,海因水解酶是一类可逆地催化海因或 5-取代海因开环水解反应的酶,在 EC 命名中被分类为环酰胺酶(EC 3.5.2)。在 EC 命名中描述了四类海因水解酶:二氢嘧啶酶(EC 3.5.2.2)、尿囊素酶(EC 3.5.2.5)、羧甲基海因酶(EC 3.5.2.4)和 N-甲基海因酶(EC 3.5.2.14);此外,还有一些已知代谢功能的海因水解酶如酰亚胺酶和羧乙基海因酶,以及一些未知代谢功能的海因水解酶,尽管在文献中已有报道,但还没有被分类^[1]。这些酶的主要区别在于底物特异性的不同以及一些独特的生化性质。

在这些酶中,研究的最多的是二氢嘧啶酶,它广泛分布于微生物、动物和植物中^[2-4],其生理功能是参与嘧啶的代谢过程(图 1A);另外它已被用于工业化生产光学纯 D-氨基酸(图 1B),用作合成抗生素、肽类激素、杀虫剂、甜味剂等的手性中间体^[2]。自 1980 年以来,

* 国家自然科学基金资助项目(39570015)

** 通讯作者

作者简介:王 宇(1971-),男(汉族),贵州贵阳人,中国科学院微生物研究所助理研究员,硕士,主要从事微生物生化及分子生物学研究。

收稿日期:2001-05-08,修回日期:2001-06-12

已有多种不同来源的二氢嘧啶酶被纯化^[5-8],其中一些酶的基因被克隆^[9-11],海因酶的分子进化也已被探讨^[12]。

最近,Ogawa 等在芽生杆菌(*Blastobacter* sp.) A17p-4 中发现了一种新的海因水解酶——酰亚胺酶^[13]。他们研究了该菌中环酰亚胺的代谢转化途径^[14],并证明了环酰亚胺的转化活性在微生物中是广泛分布的^[15]。他们将此酶纯化至均一,并测定了其 N 端 20 个氨基酸的序列^[16],发现与水解环酰脲(如海因、二氢尿嘧啶等)相比,此酶更倾向于水解环酰亚胺,如琥珀酰亚胺等(图 1C)。但到目前为止,酰亚胺酶的核酸及完整的蛋白序列尚未见报导。

我们在筛选产海因水解酶菌株的过程中,获得一株真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*) 112R₄,它能有效水解海因、二氢尿嘧啶和琥珀酰亚胺,并能在以琥珀酰亚胺为唯一碳源和氮源的培养基上生长,但对 5-取代海因和 5,5'-双取代海因没有活性,其反应活性和底物特异性与酰亚胺酶极为类似。我们从 112R₄ 基因组 DNA 出发,用鸟枪法克隆了与环酰亚胺水解相关的基因片段,并对酰亚胺酶基因进行了亚克隆和序列分析,推断出该酶的氨基酸序列,这是首次报道微生物酰亚胺酶的核酸和蛋白序列。该酶基因在大肠杆菌中得到了表达。

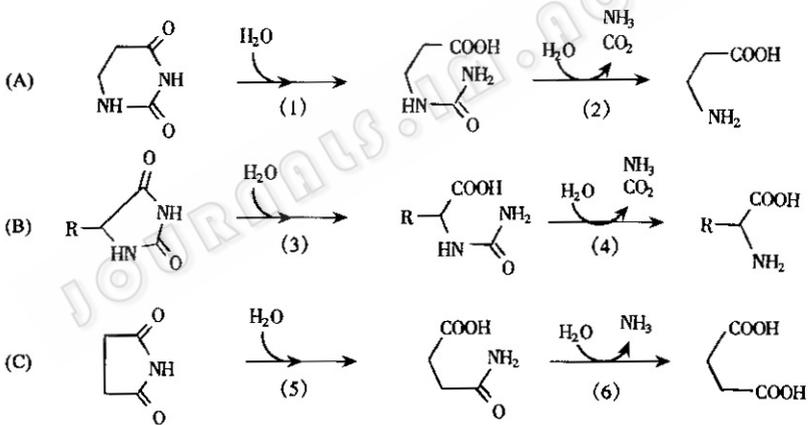


图 1 二氢嘧啶(A)、海因类化合物(B)和环酰亚胺(C)的酶法水解

Fig.1 Enzymatic hydrolysis of dihydropyrimidine(A), hydantoins(B) and cyclic-imide(C)

1. Dihydropyrimidinase; 2. β -ureidopropionase; 3. Hydantoinase; 4. N-carbamoylamino acid amidohydrolyase; 5. Imidase; 6. Amidase.

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒载体

所有供筛选菌株均为本组保藏,*E. coli* C600 和 JM109 以及克隆载体 pBR322 和 pUC19 为本组保藏;用于 PCR 产物连接的载体 pMD18-T 购自 TAKARA Biotechnology 公司。

1.2 培养基

1.2.1 培养基 I:葡萄糖 5g,酵母粉 10g,蛋白胨 10g,NaCl 5g,定容至 1L,pH7.0。

1.2.2 培养基 II:酵母粉 15g,甘油 15g,KH₂PO₄ 1g,K₂HPO₄·3H₂O 3g,海因 1g,定容至 1L,

pH7.5。

1.2.3 基础培养基 III KH_2PO_4 1g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02g, 盐酸硫胺素 20mg, 定容至 1L, pH7.0, 用于碳、氮源的研究。

1.2.4 LB 培养基: 蛋白胨 10g, 酵母粉 5g, NaCl 10g, 定容至 1L, pH7.2, 用于细菌转化。

1.2.5 培养基 IV 酵母粉 15g, 甘油 15g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, KH_2PO_4 1g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 3g, 定容至 1L, pH7.5, 用于外源基因的表达研究。

如果需要, 在培养基内添加氨基青霉素至终浓度 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.3 工具酶和生化试剂

所有的限制性内切酶以及 DNA 连接酶试剂盒、PCR 扩增反应试剂盒均购自 TAKARA Biotechnology 公司, 牛肠碱性磷酸酶购自 Promega 公司。海因和琥珀酰亚胺购自 Fluka 公司, 二氢尿嘧啶、海因酸和 β -脲基丙酸购自 Sigma 公司, 尿嘧啶购自 Aldrich 公司, 5-苯基-5-乙基海因购自 SIPSY 公司, 多种 5-取代海因由微生物研究所孙万儒老师提供, 其余常用分子生物学试剂和生化试剂为进口或国产分析纯试剂。

1.4 常规的分子生物学方法参考文献 [7]

1.5 产海因水解酶菌株的筛选

从牛肉汁斜面接一环菌苔于 3mL 液体培养基 I 试管中, 30°C 摇床培养 24h, 取 1mL 菌液接种 30mL 液体培养基 II 摇瓶, 30°C 摇床培养 16~18h, 测定细胞生长 (A_{600}), 取适量细胞培养液测定海因水解酶活力。

1.6 海因水解酶活性分析

取适量细胞培养液, 用 $0.1\text{mol}/\text{L}$ Tris-HCl ($\text{pH}8.0$) 缓冲液洗涤, $2800\text{r}/\text{min}$ 离心 30min, 加入 1mL 同样缓冲液悬浮菌体, 37°C 预热 15min, 加入 1mL 含底物 ($100\text{mmol}/\text{L}$ 海因、 $50\text{mmol}/\text{L}$ 二氢尿嘧啶或 $50\text{mmol}/\text{L}$ 琥珀酰亚胺) 的缓冲液, 37°C 反应 15 至 60min, 加入 0.5mL 12% (w/v) 的三氯醋酸溶液终止反应。对于以海因或二氢尿嘧啶为底物的反应, 加入 0.5mL 溶于 $6\text{mol}/\text{L}$ HCl 的 5% (w/v) 对二甲氨基苯甲醛溶液显色, $12000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min, 上清液于 438nm 比色, 以不含细胞的反应液为对照, 参照以海因酸和 β -脲基丙酸标准品制作的标准曲线进行计算。对于以琥珀酰亚胺为底物的反应, 终止后直接离心, 上清液经适当稀释后用 HPLC 进行分析, 使用 Bio-Rad400 型高压液相色谱仪, Zorbax SB-C18 柱 ($4.6\text{mm} \times 250\text{mm}$), $250\text{mmol}/\text{L}$ KH_2PO_4 ($\text{pH}4.4$) 甲醇 ($\text{v}/\text{v} = 95/5$) 为洗脱液, 流速 $1\text{mL}/\text{min}$, 210nm 检测。所有测定同时做三个平行样。

活力单位定义: 一个活力单位 (U) 为在上述反应条件下, 每分钟转化 $1\mu\text{mol}$ 底物或生成 $1\mu\text{mol}$ 产物所需的细胞量。

1.7 重组子的筛选

带有酰亚胺酶基因的重组子的筛选采用微孔板检测法^[18], 以海因为底物。

1.8 DNA 序列测定

DNA 测序工作由 TAKARA Biotechnology 公司完成。

1.9 PCR 扩增

PCR 扩增的方法用于确定酰亚胺酶的开放阅读框, 所用的引物 (表 1) 由 TAKARA Biotechnology 公司合成。使用北京君意公司 WD9402 型 DNA 扩增仪, 94°C 变性 30s, 50°C 复性

30s, 72℃ 延伸 1min, 扩增反应进行 30 个循环。

表 1 用于 PCR 扩增的引物

Table 1 Oligonucleotide primers for PCR amplify

Primers	Nucleotide positions *	Sequence
IMA-0	140 - 164	5' - AAGAATTCATGCCGTGGCGGCTGG - 3'
IMA-1	13 - 37	5' - AAGAATTCATGACGACCGGCTGCTG - 3'
IMA-2	100 - 124	5' - AAGAATTCATGAGCAAGGACATACA - 3'
IMA-3	991 - 967	5' - TTGAATTCTCAACGGAGGTATTCAT - 3'
IMA-4	1036 - 1012	5' - TTGAATTCATGGCGGAGGTATTCAT - 3'
IMA-5	895 - 871	5' - TTGAATTCAGCATGAGCAGCACCT - 3'

* The positions correspond to the number of nucleotide sequence of the imidase gene from *A. eutrophus* 112R₄ (Fig. 5).

2 结果

2.1 产海因水解酶菌株的筛选与鉴定

对本组保藏的 245 株细菌进行筛选, 分析其海因水解酶活力, 发现有 21 株菌具海因水解活性, 其中 16 株菌具二氢尿嘧啶水解活性, 4 株菌能水解琥珀酰亚胺。其中一株菌 112R₄, 对海因、二氢尿嘧啶和琥珀酰亚胺都具有较高的水解能力(图 2)。该菌用于以后的研究。

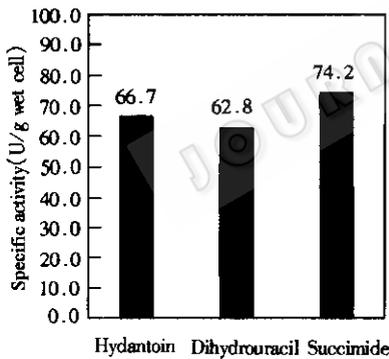


图 2 112R₄ 菌对不同底物的水解活力

Fig. 2 Hydrolysis activities of 112R₄ for various substrates

分析了 112R₄ 菌对其它海因类化合物的水解活性, 这些化合物为尿嘧啶、5-吡啶甲基海因、5-异丁基海因、5-甲基海因、5-胍乙基海因、5-对羟基苯海因、5-羟甲基海因、5-甲硫乙基海因、5-苯基海因、海因-5-乙酸、海因-5-丙酸和 5 苯基-5-乙基海因。该菌对以上所有化合物均无水解活性。

以培养基 III 为基础培养基, 添加不同化合物为碳、氮源进行培养研究, 发现 112R₄ 菌能在以琥珀酰亚胺为唯一碳源和氮源的培养基上生长, 而在以海因和尿嘧啶为唯一碳源的培养基上不能生长, 表明 112R₄ 菌具有琥珀酰亚胺完整的转化利用途径。

以上结果表明, 112R₄ 菌中的海因水解酶与芽生杆菌 A17p-4 中的海因水解酶——酰亚胺酶^[16]的性质极

为相似, 应属同一种酶。

112R₄ 菌由中国科学院微生物研究所菌种保藏与鉴定中心鉴定为真养产碱杆菌 (*Alcaligenes eutrophus*)。

2.2 酰亚胺酶基因的克隆与亚克隆

提取真养产碱杆菌 112R₄ 菌的基因组 DNA, 分别用 *Eco*RI、*Bam*HI 和 *Hin*dIII 完全酶

切,与用相应酶切并用碱性磷酸酶处理后的载体 pBR322 连接,转化大肠杆菌 C600,涂布 LB + Amp 平板。采用微孔板检测法,从大约 6000 个转化子中筛选到一个阳性克隆,提取质粒 DNA,发现其中含有一个 6kb 左右的 *EcoRI-EcoRI* 插入片段。将此片段连入 pUC19,得到重组质粒 pHWY304,带有该质粒的大肠杆菌 JM109 对海因、二氢尿嘧啶和琥珀酰亚胺都具有水解能力,并能在以琥珀酰亚胺为唯一碳源和氮源的培养基上生长。我们对该 6kb 左右的插入片段进行了测序。质粒 pHWY304 的图谱及部分酶切位点见图 3。

为了确定酶亚胺酶基因在该插入片段中的位置,我们从 pHWY304 出发,用不同的限制性内切酶酶切,利用 pUC19 载体构建了一系列缺失衍生质粒(图 4),转化大肠杆菌 JM109,检测转化子的海因水解活性。结果表明,一个 2024bp 的 *PstI-PstI* 片段(含于质粒 pHWY409 中)与海因水解活力相关;带有质粒 pHWY409 的大肠杆菌 JM109,对海因、二氢尿嘧啶和琥珀酰亚胺都具有水解能力,但不能在以琥珀酰亚胺为唯一碳源的培养基上生长。值得注意的是,所有的片段当反方向插入载体时,均不能表现出海因水解活力,从而使我们可以确定酰亚胺酶基因在此 DNA 片段中的方向。

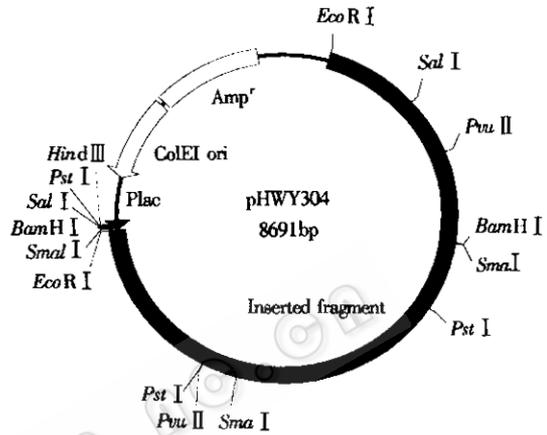


图 3 重组质粒 pHWY304 图谱
Fig.3 Recombinant plasmid of pHWY304

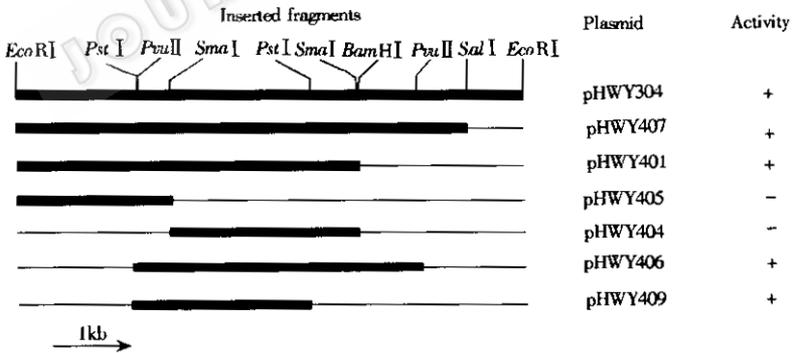


图 4 酰亚胺酶基因的亚克隆
Fig.4 Subcloning of imidase gene

2.3 开放阅读框的确定及序列分析

我们对这个 2024bp 的 *PstI-PstI* 片段再次进行了序列测定,确认了其核酸序列。使用 pDRAW32 程序对此 DNA 序列进行了阅读框架分析,只发现了一个完整的 ORF(图 5)。为了准确地确定此 ORF 的起止位置,我们采用 PCR 扩增的方法,扩增了不同起止位点的 DNA 片段(图 6),使用 pMD18-T 载体进行克隆,转化大肠杆菌 JM109,检测转化子的海因

```

1   GCTGATGCGCCCGCAGGGCGATGACGACCGGCTGCTGCGCATTGCCCTGGCCGTCGAACA
61  GGGCCTTTCTCCCTCAACCGTTCCCAAGTGAAAAAAGGAGTGCATGCAATGAGCAAGGACA
                                         M S K D I
                                         ORF (IM)
121 TACAGATCAGCTTTGGCGTGGACGTGCGATGCCGTCGGCGGGCTGGCTCGTATGGCG
    Q I T F G V D V D A V G G W L G S Y G G
181 GGGAGGACTCGCCCGACGACATCTCGCGGGCATGTTGCGGGGCGAGGTGCGCTCGCTGC
    E D S P D D I S R G M F A G E V G S L R
241 GGCTGCTCAGGCTGTTGACAAATACGGCCTCAAGACCACCTGGTTCATCCCGGGCCACT
    L L R L F F D K Y G L K T T W F I P G H S
301 CCGCCGAGACCTTTCCCGAGCAGATGAAGGCCGTGGTGGACGCGGGCCATGAGATCGGCA
    A E T F P E Q M K A V V D A G H E I G I
361 TCCACGGCTACAGCCACGAGAACCAGATTGCCATGACGCCCGAGCAGGAGGAAGCGGTGC
    H G Y S H E N P I A M T P E Q E E A V L
421 TCGACCCAGCATCGAGGTGATCAGCGGGCTGCGCGGCGTACCQCCAGGGCTATGTGG
    D R S I E V I T R L A G R V P T G Y V A
481 CGCCCTGGTGGGAGTTCAGCCCCGTACCAACGAGCTGCTGCTCAAGAAAGGCATCAAGT
    P W W E F S P V T N F L L L K K G I K Y
541 ACGACCACAGCCTTGATGCACAACGACTTCCACCCGTACTACGTGCGCCATGGGCGCAGT
    D H S L M H N D F H P Y Y V R V G D Q W
601 GGACCCGCATCGACTACAACAAGCATCCCGACACCTGGATGAAGCCCTGGTGC GCGGAA
    T R I D Y N K H P D T W M K P L V R G K
661 AGGAAACCGCGCTGTCGAGATCCCCGCCAACTGGTACGACCGTGGCCGCCATGA
    E T R L V E I P A N W Y L D D L P P M M
721 TGTTCATCAAGAAGTCGCCCAACAGCCACGGCTTCGTCAACCCGCGCGACATAGAGCAGA
    F I K K K S P N S H G F V N P R D I E Q M
781 TGTGGCGACACAGTTCGACTGGGTCTACCGCGAGCAGCTACGCGDTTCCCCATCA
    W R D Q F D W V Y R E H D Y A V F P I T
841 CCATCCACCCGATGTCTCCGGCCGCCCCAGGTGCTGCTGATGCTGGAGCGCCTGATCG
    I H P D V S G R P Q V L L M L E R L I E
901 AGCATTCCAGTGCACGACGGCGTGCCTTCATGACGTGCGACCCAGATCGCCGACGACT
    H F T Q S H D G G V R F M T C D Q I A D D F
961 TCCTGCGCCGCCAGCCGCTTGATGCCGCATCCCACCTCAGCGAGGACACCATGAATACC
    L R R Q P R *
1021 TCCGCCATTGCCTCCGACGCCCCAGGCGCCGGCCATCCGGCCCCGGCCGGGACCGATGCC
1081 CCGTGGACCGCGCCACCGTGCACGCGCAGGCAGGTACGCTACGCCACCTGGGTCTGCTTT
1141 TTCGCTGGGTGTTGCGCGTCTACGACTTCATCCTCTTCGGCACCTGCTGCCGCAACTG
1201 GCGGAGCACTCCGGTGGAGCGCCGAGCAGCAGGCGCGCTGAACACCTGGGTGACGCTG
1261 GGCACGGTGATCCGTGCGCTTCGGCATCGCCCCATCGCCGACCGGCTGGCCCGCGCAA
1321 GGCATCATCGCTCGCTGGCGCGCGCTGCTGCTCGGGCTGACGCGCTGGCCGCGC
1381 TGGGTGATCGGGCTGTCGGCGGGGCTGGGCTTCGTGCTGCTGATCGTGGTGCCTCGCTG
1441 GCGGGCCTGGGCTACGCCGAGCAAGCATCAACGCCACCTACCTGAGCGAGCTGTTCTCC
1501 CTGGTGTACACCGACCCGGCCTCGCTGCGCGCGGTGGCTTCATCTACTCGCTGGTGCAG
1561 GCGGCTGGCCCGTGGCGCCGTGCTACCGECGTGTTGGTGGCCCTGCTGTATCCGCTG
1621 GGCGAGCGCTGGTTCGGCCAGGGCGGGCGGCTGGGCGCTGTCCTTCGTGTTCGCCATGTT
1681 CCGGCCCTGGTGTGTCGCGTGTGGGCGACGGTGGTGGAGACGCCCGAGTTCCTGACC
1741 GCGCGTGCCTGGCCGATCTGCGCCGCGCCGGGCGGAGGACAGGCCATCGCCTGGCG
1801 CAGGAGCATGGCCAGCCACAGCAGGAGCAGCACACCGCCTGTGCGGCATGTTCCGC
1861 GGTGCTCGCTGCGGCCACGCTGTGCTGGCCCTGGGCTTTTCTGAACTGGTTCGCC
1921 ATCGTGATCTTCGCGTGCTGGGCACCTCGGTGCTGGGCACCTCGGTGCTGGCGGGCGCG
1981 GCGGCGACCGCGGCAAGGGCGTGGATTTCTCCAGCGCGCTGCA

```

图5 含真养产碱杆菌 112R₄ 酰亚胺酶基因的 2024bp *Pst*I-*Pst*I 片段的核酸序列及推断的氨基酸序列

Fig.5 Nucleotide sequence of the 2024bp *Pst*I-*Pst*I fragment containing the imidase gene of *A. eutrophus* 112R₄ and the deduced amino acid sequence of the ORF(IM)

Translation stop codon is indicated with an asterisk. The putative ribosome binding site is underlined. (CenBank accession number: AF373287).

表 2 重组大肠杆菌对几种底物的水解能力

Table 2 Hydrolysis activities of recombinant *E. coli* to various substrates.

Strain(plasmid)	Cell density* /A ₆₀₀	Specific activities(U/g wet cell)		
		Hydantoin	Dihydrouracil	Succimide
JM109	11.0	0	0	0
JM109(pHWY304)	11.3	158	117	175
JM109(pHWY409)	10.1	223	187	251
JM109(pHWY523)	10.8	200	153	246

* Cells cultivated in medium IV until absorbance at 600 nm reached 1.8 were induced with 1mmol/L IPTG for 5h.

表 3 诱导物和诱导时间对重组大肠杆菌 JM109(pHWY523)产酶的影响

Table 3 Effect of inducer and induction time on the production of imidase by recombinant *E. coli* JM109(pHWY523)

Substrates	Specific activities(U/g wet cell)*					
	Induced for 3h			Induced for 5h		
	Control	IPTG	Lactose	Control	IPTG	Lactose
Hydantoin	52	185	50	78	200	75
Dihydrouracil	33	140	36	55	153	53
Succimide	54	220	55	87	246	92

* Cells cultivated in medium IV until absorbance at 600 nm reached 1.8 were induced with 1mmol/L IPTG or 5mmol/L lactose.

3 讨论

目前只发现了两种酶可以水解环状酰亚胺类化合物,一种是二氢嘧啶酶^[19,20],另一种是从芽生杆菌 A17p-4 中发现的酰亚胺酶^[16]。鼠肝二氢嘧啶酶^[19]能水解简单的和取代的环状酰脲和环状酰亚胺,芽生杆菌 A17p-4 的二氢嘧啶酶^[20]能水解简单的和取代的环状酰脲及取代的环状酰亚胺,不能水解简单的环状酰亚胺,而芽生杆菌 A17p-4 的酰亚胺酶则只能水解简单的环状酰脲和环状酰亚胺,且对环状酰亚胺的水解活力更高。我们筛选到的真养产碱杆菌 112R₄,它的海因水解酶只能水解简单的环状酰脲和环状酰亚胺,不能水解取代的环状酰脲,因而不同于二氢嘧啶酶,而应归类于酰亚胺酶,推测的氨基酸序列与 A17p-4 的酰亚胺酶氨基端序列具有较高的同源性(图 6);计算分子量 33.688kD,接近于 A17p-4 酰亚胺酶的亚基分子量 35kD^[16],这些结果也支持了这一推断。这是首次报道真养产碱杆菌具有酰亚胺酶活性。

利用氨基酸序列的比较来研究不同海因水解酶的进化关系,已有多篇报道^[1,12,21]。结果表明,大多数的海因水解酶属于一个与脲酶相关的氨酰水解酶蛋白超家族^[22],这个蛋白超家族包括了二氢嘧啶酶、CRM 蛋白、尿囊素酶、二氢乳清酸酶和脲酶。然而,因为缺少蛋白序列,酰亚胺酶与其它的海因水解酶的进化关系还没有被研究^[1]。本工作是酰亚胺酶的核酸与蛋白序列的第一次报道,我们使用 Phylip95 程序,将真养产碱杆菌 112R₄ 的酰亚胺酶氨基酸序列与已知的 35 种环酰胺酶(包括二氢嘧啶酶、二氢乳清酸酶、尿囊素酶、脲酶和 L-海因酶)的氨基酸序列进行了系统发育分析,结果表明,酰亚胺酶不属于氨酰水解酶蛋白超家族,它不同于所有已知的海因水解酶而形成一个新的分支。这一结果,以及该酶与其它环酰胺酶的底物特异性不同,表明酰亚胺酶应被分类为一种新的环酰胺酶。

酰亚胺酶与二氢嘧啶酶相比,尽管催化的反应极为类似(图 1),但它们的生理功能却完全不同。二氢嘧啶酶被认为参与了嘧啶的还原降解途径^[23],而酰亚胺酶的生理功能则被认为可能是参与了异生物质(xenobiotics)的降解^[15,19]。Ogawa 等^[14]推测了芽生杆菌 A17p-4 中琥珀酰亚胺的代谢转化途径(图 8),因为真养产碱杆菌 112R₄ 也能利用琥珀酰亚胺为唯一碳源生长,同样的代谢转化途径也可能存在于该菌中;但目前还未发现琥珀酰亚胺为自然的代谢物,因而要证实这一推测的代谢功能,还需要更多的证据。真养产碱杆菌 112R₄ 中酰亚胺酶的纯化与性质研究以及酰亚胺酶基因相邻的其它基因的功能研究,将为解决这一问题提供更多的信息,目前这方面的工作正在进行中。

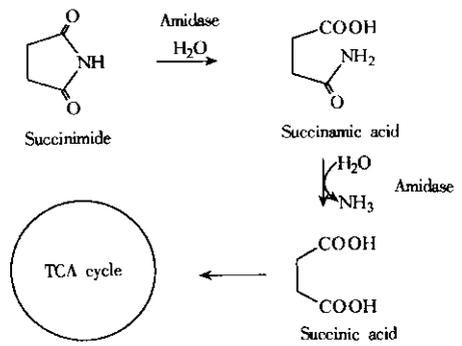


图 8 推测的琥珀酰亚胺的代谢转化途径

Fig.8 Proposed pathway for succinimide metabolic transformation. TCA, tricarboxylic acid

致谢 中国科学院微生物研究所的孙万儒老师提供了多种 5-取代海因,中国科学院微生物研究所菌种保藏与鉴定中心进行了菌种鉴定,特此感谢!

参 考 文 献

- [1] Syldatk C, May O, Altenbuchner J, et al. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **51**:293 ~ 309.
- [2] Syldatk C, Laufer A, Hoke H. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1990, **41**:29 ~ 75.
- [3] Vogels C D, Van der Drift C. *Bacteriol Rev*, 1976, **40**:403 ~ 468.
- [4] Yamada H, Takahashi S, Kij Y. *J Ferment Technol*, 1978, **56**:484 ~ 491.
- [5] Kautz J, Schnackerz K-D. *Eur J Biochem*, 1989, **181**:431 ~ 435.
- [6] Lee S-G, Lee D-C, Kim H-S. *Appl Biochem Biotechnol*, 1997, **62**:251 ~ 266.
- [7] Luksa V, Starkuviene V, Starkuviene B, et al. *Appl Biochem Biotechnol*, 1997, **62**:219 ~ 232.
- [8] Morin A, Hummel W, Schutte H, et al. *Biotechnol Appl Biochem*, 1986, **8**:564 ~ 574.
- [9] Wastabe K, Ishikawa T, Mukohara Y, et al. *J Bacteriol*, 1992, **174**:962 ~ 969.
- [10] Kim G-J, Park J-H, Lee D-C, et al. *Mol Gen Genet*, 1997, **255**:152 ~ 156.
- [11] Mukohara Y, Ishikawa T, Watabe K, et al. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, **58**:1621 ~ 1626.
- [12] May O, Habenicht A, Mattes R, et al. *Biol Chem*, 1988, **379**:743 ~ 747.
- [13] Ogawa J, Honda M, Soong C L, et al. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, **59**:1960 ~ 1962.
- [14] Ogawa J, Soong C L, Honda M, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(10):3814 ~ 3817.
- [15] Soong C-L, Ogawa J, Sukiman H, et al. *FEMS Microbiol Lett*, 1988, **158**:51 ~ 55.
- [16] Ogawa J, Soong C-L, Honda M, et al. *Eur J Biochem*, 1997, **243**:322 ~ 327.
- [17] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [18] Chien H-G, Hsu W-H. *Biotechnol Tech*, 1996, **10**(11):879 ~ 882.
- [19] Yang Y S, Ramaswamy S, Jakoby W B. *J Biol Chem*, 1993, **268**:10870 ~ 10875.
- [20] Soong C-L, Ogawa J, Honda M, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(4):1459 ~ 1462.
- [21] Kim G-J, Kim H-S. *Biochem J*, 1998, **330**:295 ~ 302.

- [22] Holm L , Sander C. *Proteins* ,1997 **28** :72 ~ 82 .
[23] Campbell Jr L L. *J Biol Chem* ,1958 **233** :1236 ~ 1240 .

Cloning , Sequence Analysis of Imidase Gene from *Alcaligenes eutrophus* and Its Expression in *E . coli* *

Wang Yu Zhang Yingzi Ding Jiuyuan Liu Yangjian Wang Jiang Yu Zhihua **
(Institute of Microbiology , The Chinese Academy of Science , Beijing 100080 , China)

Abstract : A hydantoin-cleaving microorganism 112R₄ is screened and identified to be *Alcaligenes eutrophus* . The resting cell of *Alcaligenes eutrophus* 112R₄ can catalyze the hydrolysis of hydantoin , dihydropyrimidine and succinimide effectively , but not function to 5-monosubstituted hydantoin or 5,5'-disubstituted hydantoin . The microorganism can utilize succinimide as a sole carbon source and nitrogen source , which indicates the presence of a complete transformation pathway of succinimide , and a hydantoin-cleaving enzyme , imidase , is suggested to be contained in this metabolic pathway . A 6kb *EcoRI-EcoRI* fragment isolated from the genome DNA of *Alcaligenes eutrophus* 112R₄ is shown to be correlative with the transformation of succinimide . A 2kb DNA fragment containing the gene of imidase is subcloned and sequenced . Deletion analysis verifies that one open reading frame of 876 nucleotides , which encodes a peptide of 291 amino acids , with a calculated molecular weight of 33688 , is responsible for the encoding of imidase . This is the first report of the nucleotide and amino acid sequences of imidase (GenBank accession number : AF373287) . A homology search performed in protein database reveals an identity of 14% with polysaccharide deacetylase conserved domain , an identity of 60% with N-terminal 20 amino acids of *Blastobacter* sp. A17p-4 , but no apparent similarity with all known cyclic-amide-cleaving enzymes . This result suggested that the imidase should be classified as a new member of cyclic amidases . Under the control of *lac* promoter and IPTG induction , the imidase activity of transformed *E . coli* reached 3200U/L , which is about 7-fold higher than that of gene donor strain .

Key words : Imidase , Gene cloning , Sequence analysis , Gene expression , *Alcaligenes eutrophus*

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China(39570015)

** To whom correspondence should be addressed