

真养产碱杆菌 112R₄ 的二羧酸单酰胺酰胺水解酶*

张英姿 王 宇 余志华 刘阳剑 王 绛 丁久元*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 在一株具有环酰亚胺转化活性的真养产碱杆菌 112R₄ 中发现了一种特异性的二羧酸单酰胺酰胺水解酶(半酰胺酶),它催化环酰亚胺代谢的第二步反应,将二羧酸单酰胺水解为二羧酸和氨。该酶的底物仅限于此代谢途径的第一个酶——酰亚胺酶的产物二羧酸单酰胺,而对其它的酰胺类化合物没有明显水解活性。真养产碱杆菌 112R₄ 中的半酰胺酶和酰亚胺酶在表达上具有相关性,环酰亚胺(如琥珀酰亚胺)和二羧酸单酰胺(如琥珀酰胺酸)对它们有正调控作用,游离氨离子显示出负调控作用,琥珀酸则在酶合成和活性两方面均表现出影响作用。对重组大肠杆菌中表达的半酰胺酶粗酶的部分性质进行了研究。钴离子对半酰胺酶的活性表现出促进作用,比活力提高到 3.37 倍,表明半酰胺酶可能是一种金属结合酶。

关键词 二羧酸单酰胺酰胺水解酶,半酰胺酶,环酰亚胺代谢,酰亚胺酶,真养产碱杆菌

中图分类号 Q55 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2003)01-0087-07

环酰亚胺是一类环酰胺化合物,长期以来,有关环酰亚胺代谢的研究一直是与一些抗癫痫药物,如 3-乙基-5-苯基海因和 N-甲基- α -苯基琥珀酰亚胺等在哺乳动物体内的脱毒作用相关的^[1,2]。最近, Ogawa 等^[3]首先在一株芽生杆菌 *Blastobacter* sp. A17 p-4 中发现了一条新的环酰亚胺代谢途径(图 1),随后的研究表明,这一代谢途径广泛存在于细菌、酵母和霉菌中^[4]。作为一种生产有机酸的新路线以及酶法合成手性化合物的新工具,微生物环酰亚胺代谢途径及其相关酶类显示出了广泛的应用潜力^[5,6]。

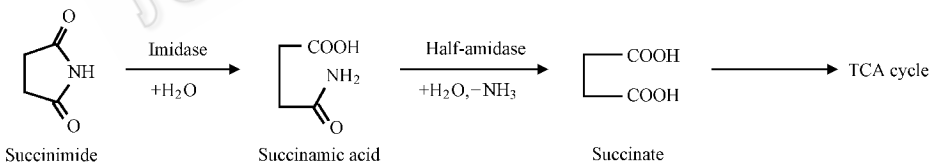


图 1 推测的琥珀酰亚胺代谢途径

Fig. 1 Proposed metabolic pathway for succinimide
TCA tricarboxylic acid

到目前为止,只有芽生杆菌 A17p-4 中的环酰亚胺转化途径研究得较为详细^[7],其中包括了两个关键酶:酰亚胺酶(imidase)和二羧酸单酰胺酰胺水解酶(dicarboxylate mono-

* 通讯作者, E-mail: dingjy@sun.im.ac.cn

作者简介 张英姿(1970-)女,浙江天台人,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。E-mail: zhangyzi@163.com

收稿日期 2002-04-23,修回日期 2002-08-24

amide amidohydrolase), 后者也称为半酰胺酶(half-amidase)。芽生杆菌 A17p-4 中的酰亚胺酶^[8]和半酰胺酶^[9]已被纯化并进行了性质研究。

在以前的工作中^[10], 分离到一株具有环酰亚胺转化能力的微生物——真养产碱杆菌 *Alcaligenes eutrophus* 112R₄, 并证明了它含有酰亚胺酶; 我们从真养产碱杆菌 112R₄ 的基因组 DNA 出发, 克隆了一个 6kb 的与环酰亚胺水解相关的 DNA 片段, 并通过亚克隆和缺失分析确定了为酰亚胺酶编码的基因, 首次报道了微生物酰亚胺酶完整的核酸和蛋白序列。

本文通过对真养产碱杆菌 112R₄ 及重组大肠杆菌进行酶活分析, 进一步确定了真养产碱杆菌 112R₄ 中含有特异性的二羧酸单酰胺酰胺水解酶(半酰胺酶), 并通过诱导分析和酶活抑制实验研究了该菌中酰亚胺酶和半酰胺酶表达的特点, 发现了琥珀酸和氨离子在环酰亚胺代谢中具有重要的调节作用, 同时对重组酶的部分性质进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒载体

真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*) 112R₄ 为本组筛选并保藏^[10], *E. coli* JM109 及载体 pUC19 为本组保藏, 质粒 pHWY304 为本组构建, 它是在 pUC19 的 *Eco*R1 位点插入了一个 6kb 的来自真养产碱杆菌 112R₄ 基因组 DNA 的片段而构建成的^[10]。

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, 用水定容至 1L, pH7.0, 为种子培养基。

1.2.2 培养基 II: KH₂PO₄ 1.0g, K₂HPO₄·3H₂O 3.0g, MgSO₄·7H₂O 0.2g, 用水定容至 1L, pH7.0 根据需要加入不同碳、氮源。

1.2.3 LB 培养基: 蛋白胨 10g, 酵母粉 5g, NaCl 10g, 用水定容至 1L, pH7.2, 用于重组大肠杆菌的表达研究, 如果需要, 在培养基中添加氨苄青霉素至终浓度 100μg/mL。

1.3 生化试剂

海因、琥珀酰亚胺和 β-脲基丙酸购自 Fluka 公司, 琥珀酰胺酸为 Aldrich 公司产品, 琥珀酰胺购自 ACROS 公司, 海因酸购自 Sigma 公司, 多种 N-氨甲酰-氨基酸采用 Suzuki 等的方法^[11]从相应的氨基酸合成。其余常用生化试剂为进口或国产分析纯试剂。

1.4 粗酶液的制备

对于真养产碱杆菌 112R₄, 从 LB 平板接一环菌苔于 3mL 液体培养基 I 试管中, 30℃ 摇床培养 24h, 取 1mL 菌液接种 30mL 含不同碳、氮源的培养基 II 摇瓶, 30℃ 摇床培养 16 ~ 18h, 测定细胞生长 (A_{600}) 6 000 r/min 离心 5min, 收集细胞。

对于重组大肠杆菌, 从 LB + Amp 平板接一环菌苔于 3mL 液体 LB + Amp 培养基试管中, 37℃ 摇床培养 16h, 取 0.2mL 菌液接种 30mL LB + Amp 培养基摇瓶, 37℃ 摇床培养至 A_{600} 达到 0.4 左右, 加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 37℃ 摇床继续培养 4h, 测定细胞生长 (A_{600}) 6 000 r/min 离心 5min, 收集细胞。

细胞用 0.1mol/L Tris-HCl (pH7.5) 缓冲液洗涤两次, 再用适量同样缓冲液悬浮, 加入 DTT 至终浓度 1mmol/L。细胞悬浮液在 0℃ 超声破壁 10min, 细胞破碎液在 4℃

12 000r/min 离心 30 min, 以上清液作为粗酶液进行酶活分析。

1.5 酶活分析

酰亚胺酶活力按以前方法测定^[10], 以 100mmol/L 海因为底物。

酰胺水解酶活力采用奈斯勒试剂测定^[12]。反应体系为在 1.5mL 的 0.1mol/L Tris-HCl (pH7.0) 缓冲液中, 含有 20mmol/L 琥珀酰胺酸(或其它底物)及适量酶液, 37℃ 反应 15 到 30min, 加入 0.5mL 15% 的三氯醋酸溶液终止反应, 12 000 r/min 离心 10min, 取上清液 0.5mL 加入 2mL 水以及 0.5mL 奈斯勒试剂, 显色 15min, 0.5cm 光程比色杯 500nm 比色, 以不含酶液的反应液为对照, 参照以硫酸铵制作的标准曲线进行计算。

酰基转移酶活力采用羟胺与酰基供体反应生成酰基氧肟酸的方法测定^[13]。

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 μ mol 底物或生成 1 μ mol 产物所需的酶量。

1.6 高压液相色谱分析

高压液相色谱分析用于鉴定转化反应产物。细胞或酶促转化反应上清液经适当稀释后注入 HPLC 进行分析, 使用 Bio-Rad 400 型高压液相色谱仪, Zorbax SB-C18 柱(4.6mm \times 250mm), 250mmol/L KH₂PO₄ (pH4.4) / 甲醇(95/5) 为洗脱液, 洗脱速度 1mL/min, 210nm 紫外检测。

1.7 蛋白测定

蛋白测定采用 Bradford^[14]的方法测定, 以牛血清白蛋白为标准蛋白。

2 结果和讨论

2.1 真养产碱杆菌 112R₄ 的二羧酸单酰胺酰胺水解酶及其底物特异性

真养产碱杆菌 112R₄ 是一株具有环酰亚胺转化能力的革兰氏阴性菌, 它能够在以琥珀酰亚胺为唯一碳、氮源的培养基中生长, 并已确定其中含有酰亚胺酶, 可以将琥珀酰亚胺转化为琥珀酰胺酸^[10]; 因此, 我们推测在该菌中应该存在能够水解琥珀酰胺酸的酶。质粒 pHWY304 是我们在以前工作中构建的, 它含有一个来源于真养产碱杆菌 112R₄ 基因组 DNA 的 6kb 的外源片段, 带有该质粒的大肠杆菌 JM109(pHWY304) 也具备了在以琥珀酰亚胺为唯一碳源的培养基中生长的能力^[10], 因此在这个 6kb 的 DNA 片段上也应该具有为琥珀酰胺酸水解酶编码的基因。

为了证实这一点, 我们使用了真养产碱杆菌 112R₄ 和重组大肠杆菌 JM109(pHWY304) 静息细胞为酶源, 以琥珀酰胺酸为底物进行细胞转化, 使用 HPLC 分析转化液的组分, 结果表明, 随着时间的延长, 琥珀酰胺酸的量逐渐下降, 而产物琥珀酸则逐渐增加, 细胞培养的结果表明真养产碱杆菌 112R₄ 和重组大肠杆菌 JM109(pHWY304) 均能够在以琥珀酰胺酸为唯一碳源的培养基中生长。这些结果都证明了在真养产碱杆菌 112R₄ 中含有二羧酸单酰胺水解酶。

以真养产碱杆菌 112R₄ 和重组大肠杆菌 JM109(pHWY304) 的细胞粗提液为酶源, 试验了它们对多种酰胺类化合物的水解能力(见表 1)。结果表明, 在所试验的化合物中, 真养产碱杆菌 112R₄ 对琥珀酰胺酸、天冬酰胺和谷氨酰胺有较高水解活性; 与带有空载体的大

肠杆菌 JM109 相比,带有 pHWY304 的重组菌只对琥珀酰胺表现出很强的水解能力,而且经过 IPTG 诱导后,对琥珀酰胺的水解活性大幅度提高。这些结果表明,真养产碱杆菌 112R₄ 中含有特异性水解二羧酸单酰胺的酶——半酰胺酶。它对一些常见的酰胺酶类,如天冬酰胺酶、谷氨酰胺酶、 β -脲基丙酸酶、N-氨甲酰-氨基酸酰胺水解酶、 ω -酰胺酶、脲酶和脂肪族酰胺酶等的底物没有明显水解活性,对二羧酸二酰胺(如琥珀酰胺)也不水解,具有类似底物特异性的酰胺酶只在芽生杆菌 A17p-4 中有过报道^[9]。

许多酰胺水解酶常同时具有酰基转移酶活力。我们以表 1 所列底物为酰基供体,在真养产碱杆菌 112R₄ 和重组大肠杆菌 JM109(pHWY304)粗酶液中均未检测到酰基转移酶活力。

真养产碱杆菌 112R₄ 的酰亚胺酶和半酰胺酶共同作用,完成从琥珀酰亚胺到琥珀酸和氨的转化过程。

表 1 真养产碱杆菌 112R₄ 和重组大肠杆菌粗酶液对酰胺类化合物的水解能力

Table 1 Hydrolysis activities of crude extracts of *A. eutrophus* 112R₄ and recombinant *E. coli* to various amides

Substrate	Specific activities of crude extracts/ (U/mg protein)			
	<i>A. eutrophus</i> 112R ₄ *	JM109 (pUC19)	JM109 (pHWY304)	Induced JM109 (pHWY304)**
Succinamic acid	0.044	0.028	0.666	1.979
Asparagine	0.266	0.036	0.020	0.033
Glutamine	0.281	0	0.014	0.018
Succinamide	0.009	0.028	0.046	0.033
Hydantoic acid	0.017	0.039	0.032	0.054
β -Ureidopropionate	0.014	0.021	0.017	0.054
DL-N-Carbomoyl-valine	0.015	0.018	0.012	0.012
DL-N-Carbomyl-phenylglycine	0.015	0.028	0.020	0.036
DL-N-Carbomoyl-phenyl-ethyl-glycine	0.019	0.021	0.017	0.021
Urea	0.014	0.043	0.020	0.024
Acrylamide	0.019	0.025	0.014	0.012

* Cells were cultivated in medium II containing 1% of succinate and 0.5% of (NH₄)₂SO₄ for 18h.

** Cells cultivated in LB medium containing 100 μ g/mL ampicillin until absorbance at 600 nm reached 0.4 were induced with 1mmol/L IPTG for 4h.

2.2 半酰胺酶与酰亚胺酶的产生

在带有质粒 pHWY304 的重组大肠杆菌中,半酰胺酶和酰亚胺酶的表达表现出很高的相关性,经 IPTG 诱导后,两酶的比活力均提高了两倍以上,分别达到 1.98 和 1.28U/mg protein。

为了研究半酰胺酶和酰亚胺酶在真养产碱杆菌 112R₄ 中的表达特点,我们以一些化合物作为唯一碳源,测定了这两个酶的比活力(表 2)。葡萄糖酸是真养产碱杆菌 112R₄ 利

用效率最高的碳源,以葡萄糖酸培养的细胞为对照,琥珀酰亚胺和琥珀酰胺酸对半酰胺酶和酰亚胺酶均表现出正调控作用,尤其是琥珀酰胺酸的诱导作用更为显著,这与这两个酶所执行的功能是一致的。这些结果说明,在真养产碱杆菌 112R₄ 中半酰胺酶和酰亚胺酶的合成是同步的。

表 2 碳源对真养产碱杆菌 112R₄ 半酰胺酶和酰亚胺酶产酶的影响*

Table 2 Effects of various carbon sources on production of half-amidase and imidase in *A. eutrophus* 112R₄

Compound	Cell growth/ OD ₆₀₀	Activity of half-amidase		Special activity of imidase/ (U/mg protein)
		Special activity/ (U/mg protein)	Relative activity/%	
D-Gluconate	6.10	0.0162	100	Trace**
Succinimide	2.17	0.0218	135	0.046
Succinamic acid	3.00	0.0840	519	0.119
Succinate	3.00	0.0407	251	Trace**
Pyruvate	4.02	0.0232	143	0.010
DL-Malate	2.84	0.0333	208	0.011

* Cells were cultivated for 18h in medium II containing 0.2% of (NH₄)₂SO₄ and 1% of various compounds.

** Less than the special activity of 0.01U/mg protein.

从表 2 中的结果我们还可以看出,一些包括在碳循环中的二羧酸对半酰胺酶也表现出诱导作用,但酰亚胺酶的比活力并没有提高,因此除了对酶合成的调控以外,它们对酶的活性可能还具有调节作用。我们在酶反应体系中添加不同量的琥珀酸,研究了琥珀酸对半酰胺酶和酰亚胺酶活性的影响(图 2)。结果表明,琥珀酸对酰亚胺酶有明显的抑制作用,而在低浓度情况下对半酰胺酶略有促进作用。因此琥珀酸对这两个酶的影响是多方面的,它可能是环酰亚胺代谢的一种重要调控物。

琥珀酰亚胺代谢既为细胞提供了碳源(琥珀酸)同时还提供了氮源(氨)。真养产碱杆菌 112R₄ 可以利用有机氮(蛋白胨、酵母膏等)和无机氮盐为氮源生长,不能利用硝基氮;在有机氮源中生长的细胞,其半酰胺酶和酰亚胺酶活力高于以氮盐为氮源培养的细胞,氮盐的种类对产酶没有明显影响。我们在以琥珀酰亚胺为碳源的培养基中添加不同浓度的氨离子,研究了游离氨对环酰亚胺代谢的影响(表 3)。结果表明,氨离子阻遏了琥珀酰亚胺的降解利用,半酰胺酶和酰亚胺酶的比活力都降低了。我们在测活反应体系中添加氨离子,结果表明氨离子对半酰胺酶和酰亚胺酶的酶活无明显影响。因

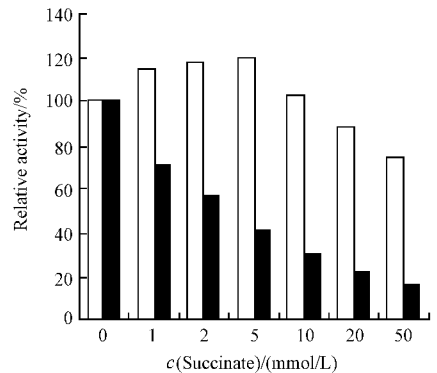


图 2 琥珀酸对半酰胺酶和酰亚胺酶活力的影响

Fig. 2 Effects of succinate on the activities of half-amidase and imidase
□ Half-amidase ■ Imidase.

此, 氨离子对这两个酶的抑制作用是在酶的合成, 即表达水平上的。我们推测, 环酰亚胺代谢途径可能是真养产碱杆菌 112R₄ 氮利用途径的一部分, 它为细胞在可直接利用的氮源紧缺的情况下提供了一条备选途径。

表 3 游离氨离子对真养产碱杆菌 112R₄ 环酰亚胺代谢的影响*

Table 3 Effects of free ammonia on the metabolism of cyclic imides in *A. eutrophus* 112R₄

Amount of (NH ₄) ₂ SO ₄ in medium II/%	Cell growth/OD ₆₀₀	Special activity of half-amidase/(U/mg protein)	Special activity of imidase(U/mg protein)
0.0	1.940	0.0360	0.0557
0.1	1.780	0.0281	0.0525
0.2	1.550	0.0165	0.0395
0.5	1.222	0.0234	0.0355
1.0	1.140	0.0222	0.0315

* Cells were cultivated for 18h in medium II containing 1% of succinimide and various amounts of (NH₄)₂SO₄

2.3 半酰胺酶的部分酶学性质

我们以重组大肠杆菌 JM109(pHWY304)的细胞粗提液为酶源, 研究了半酰胺酶的部分酶学性质。

分别在 0.1mol/L 的磷酸氢二钠—柠檬酸(pH5.0 ~ pH6.5) 磷酸氢二钾—氢氧化钠(pH6.5 ~ pH7.5) Tris-HCl(pH7.5 ~ pH8.5)和甘氨酸—氢氧化钠(pH8.5 ~ pH9.5)缓冲体系中分析了半酰胺酶的活性和稳定性。在标准分析条件下, 最适 pH 为 7.0, 在偏碱性环境下酶活力较为稳定, 在 pH8.5 时于 30°C 保温 30min, 酶活基本不变。

半酰胺酶在 40°C 表现出最高酶活力。在 0.1mol/L Tris-HCl(pH8.5)缓冲液中于 30°C 保温 30min, 酶活基本不变; 于 45°C 保温 30min, 残余酶活不到 10%。

在标准测活反应体系中添加 5mmol/L 的 EDTA 对酶活无明显影响, 添加 2mmol/L 的各种金属离子时, Zn²⁺、Cu²⁺ 和 Ag⁺ 对半酰胺酶表现出明显的抑制作用, 抑制率分别为 91.7%、87.5% 和 86.7% ; Co²⁺ 表现出明显的促进作用, 酶相对活力达到 337%, 表明半酰胺酶可能是一种金属结合酶。

参 考 文 献

- [1] Dudley K H, Roberts S B. Dihydropyrimidinase, stereochemistry of the metabolism of some 5-alkylhydantoin. *Drug Metab Dispos*, 1978, **6**: 133 ~ 139.
- [2] Yang Y S, Ramaswamy S, Jakoby W B. Rat liver imidase. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 10870 ~ 10875.
- [3] Ogawa J, Soong C L, Honda M, et al. Novel metabolic transformation pathway for cyclic imides in *Blastobacter* sp. Strain A17 p-4. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(10): 3814 ~ 3817.
- [4] Soong C L, Ogawa J, Sukiman H, et al. Distribution of cyclic imide-transforming activity in microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **158**: 51 ~ 55.
- [5] Ogawa J, Soong C L, Ito M, et al. Enzymatic production of pyruvate from fumarate—an application of microbial cyclic-imide-transforming pathway. *J Mol Catal B*, 2001, **11**: 355 ~ 359

- [6] Ogawa J , Soong C L , Ito M , *et al.* 3 - Carbamoyl - α - picolinic acid production by imidase-catalyzed regioselective hydrolysis of 2 , 3 - pyridinedicarboximide in a water-organic solvent , two-phase system. *Appl Microbiol Biotechnol* , 2000 **54** (3) 331 ~ 334.
- [7] Soong C L , Ogawa J , Shimizu S. Cyclic ureide and imide metabolism in microorganisms producing a D-hydantoinase useful for D-amino acid production. *J Mol Catal B* , 2001 , **12** 51 ~ 70.
- [8] Ogawa J , Soong C L , Honda M , *et al.* Imidase , a dihydropyrimidinase-like enzyme involved in the metabolism of cyclic imides. *Eur J Biochem* , 1997 , **243** 322 ~ 327.
- [9] Soong C L , Ogawa J , Shimizu S. A novel amidase (half-amidase) for half amide hydrolysis involved in the bacterial metabolism of cyclic imides. *Appl Environ Microbiol* , 2000 , **66** (5) :1947 ~ 1952.
- [10] 王 宇 张英姿 丁久元 等 . 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 . *微生物学报* 2002 **42** (2) :153 ~ 162.
- [11] Suzuki T , Igarashi K , Hase K , *et al.* Optical rotatory dispersion and circular dichroism of amino acid hydantoina. *Agric Biol Chem* , 1973 , **37** :411 ~ 416.
- [12] 中山大学生物系生化微生物教研室编 . 生化技术导论 . 北京 : 人民教育出版社 , 1979.
- [13] Kobayashi M , Komeda H , Nagasawa T , *et al.* Amidase coupled with low molecular mass nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* J1. Sequencing and expression of the gene and purification and characterization of the gene product. *Eur J Biochem* , 1993 , **217** 327 ~ 336.
- [14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* , 1976 , **72** 248 ~ 254.

A Dicarboxylate Monoamide Amidohydrolase (Half-Amidase) from *Alcaligenes eutrophus* 112R₄

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

Abstract : A dicarboxylate monoamide amidohydrolase (half-amidase) was identified from a cyclic-imide-metabolizing microorganism , *Alcaligenes eutrophus* 112R₄ . The enzyme catalyzed the hydrolysis of monoamidated dicarboxylates , which were the hydrolyzing products of cyclic imides by imidase , to dicarboxylates and ammonia . The enzyme showed high catalytic activity to succinamic acid , but no obvious activity to aliphatic amides , amino acid amides , N-carbamoyl amino acids and urea was observed . The productions of half-amidase and imidase were correlative in *Alcaligenes eutrophus* 112R₄ , in that succinimide and succinamic acid enhanced the expressions of these two enzymes simultaneously , while free ammonia repressed their expressions . Succinate showed regulation effects on either synthesis or activities of half-amidase and imidase . The characteristics of half-amidase were investigated by using the crude extract of recombined *E. coli* cell . The fact that cobalt ion stimulated the activity of half-amidase by a coefficient of 3.37 , implied that half-amidase was probably a metal-binding enzyme .

Key words : Dicarboxylate monoamide amidohydrolase , half-amidase , Metabolism of cyclic imide , Imidase , *Alcaligenes eutrophus*

* Corresponding author , E-mail : zlingyi@sun.im.ac.cn