

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
51(3):305-312; 4 March 2011  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 微生物 NAD 合成酶及其抑制剂的研究进展

毕继才<sup>1</sup>, 王洪海<sup>2</sup>, 谢建平<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> 西南大学生命科学学院现代生物医药研究所, 重庆 400715

<sup>2</sup> 复旦大学生命科学学院遗传学研究所, 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433

**摘要:** NAD(P) 生物代谢在能量代谢, 维持氧化还原稳态以及调节细胞寿命等许多细胞进程中有重要作用。因此, NAD 生物合成途径的关键酶的抑制剂就成为备受关注的候选新药, 如 NAD 合成酶抑制剂。本文对微生物中的 NAD 合成酶的催化活性特征, 晶体结构, 调控因子以及基于晶体结构的抑制剂设计方面进行了综述, 以期为基于 NAD 的治疗领域打开新的思路。

**关键词:** NAD 合成酶, NAD 合成酶晶体结构, 基于晶体结构抑制剂设计, NrtR 家族

**中图分类号:** Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 03-0305-08

传染病是当今世界人类健康的头号杀手, 其中结核病的治疗是一个重大课题。结核病疫情在世界范围内的急剧恶化已引起全球广泛关注。全世界约有 1/3 人口约 20 亿人感染了结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*), 现有结核病人 2000 万, 每年新发病人约 900 万, 每年死亡人数高达 300 万<sup>[1]</sup>。更为严重的是对一线药物 (异烟肼 (Isoniazidum)、利福平 (Rifampin)、链霉素 (Streptomycin) 和乙胺丁醇 (Ethambutol)) 甚至二线药物 (乙硫异烟胺 (Ethionamide)/丙硫异烟胺 (Prothionamide)、环丝氨酸 (Cycloserine)、对氨基水杨酸 (P-aminosalicylic acid)) 的耐受的菌株层出不穷。因此, 寻找更有效的新型药物来治疗这个顽固性疾病是摆在医药工作者面前的重要课题。而寻找良好的药物靶标已经成为新药研发成功与否的关键。

随着生物信息学、功能基因组学、功能蛋白质组学的出现和发展, 许许多多的蛋白质分子功能将很

快得以阐释, 这将为新型药物的发现和发展提供更多潜在的靶标<sup>[2]</sup>。而细胞中重要的生理代谢过程, 如三羧酸循环途径, 脂肪酸合成途径, 维生素类生物合成途径等备受研究者关注。NAD 作为辅酶参与生物体内诸多生化反应, 而且参与活细胞的代谢调控、蛋白翻译后修饰、DNA 修复、端粒的保护、基因沉默、细胞寿命、免疫应答和  $Ca^{2+}$  信号通路等都有重要作用。因此, NAD 生物合成途径中关键酶被认为是重要的药物靶标开发的资源库<sup>[3]</sup>。人体内 NAD 生物合成共有 4 条途径<sup>[4]</sup>: 从头合成途径 (Try)、补救途径、再循环途径、NRK - 依赖途径 (NRK: Nitotinamide Ribose Kinase)<sup>[5]</sup>。而主要致病菌中如结核分枝杆菌包含从头合成途径 (Asp) 和补救途径<sup>[6]</sup>, 但在炭疽杆菌和土拉杆菌等还包含有再循环途径和 NRK-依赖途径<sup>[7]</sup> (如图 1)。其中 NAD 合成酶 (*nadE*; EC 6.3.1.5) 广泛存在于生物界中。微生物对 NAD 合成酶的依赖性比人体更高; 而且

**基金项目:** 国家重要传染病十一五科技重大专项 (2008ZX10003-006, 2008ZX10003-001)

\* 通信作者。Tel: +86-23-68367108; Fax: +86-23-68252365; E-mail: georgex@swu.edu.cn, jianpingxiefudan@gmail.com

**作者简介:** 毕继才 (1983 -), 男, 河南省商丘市人, 硕士研究生, 研究方向为微生物功能基因组学与新型药物靶标筛选。E-mail: bijicai1983@126.com

**收稿日期:** 2010-07-21; **修回日期:** 2010-09-22

NAD 合成酶在微生物与人体之间很大差异,如人体与结核分枝杆菌的 NAD 合成酶在一级结构的相似

度仅有 23%<sup>[8]</sup>,其晶体结构,底物偏好性均有差异,因此该酶被认为是优良的新型药物靶标。

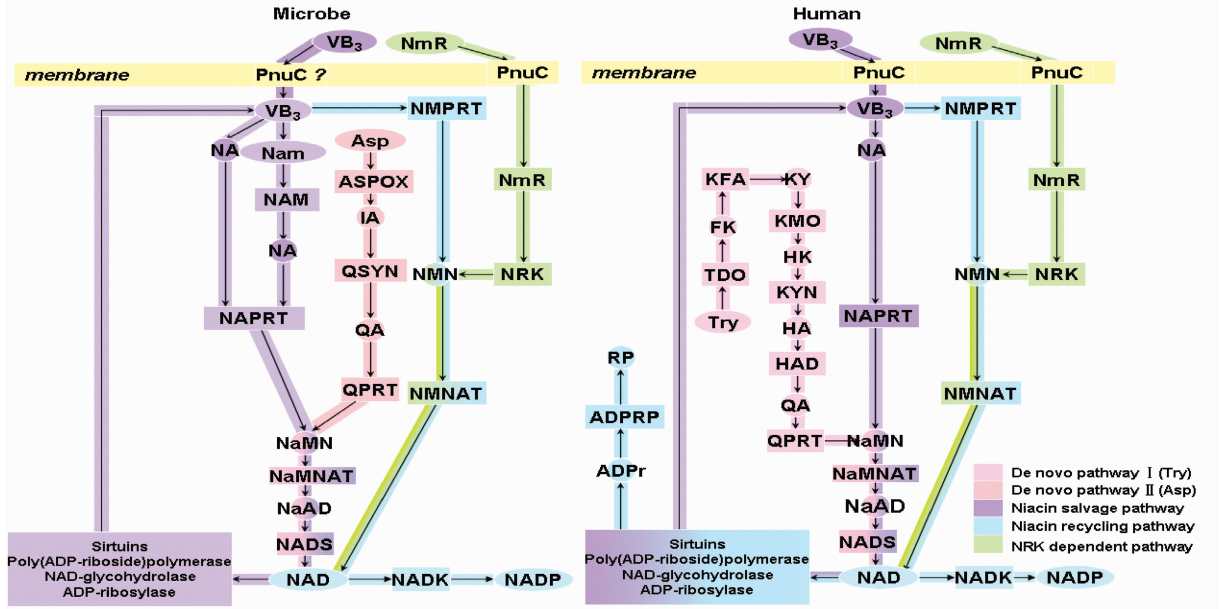


图1 微生物与人体 NAD 生物合成途径差异

Fig.1 The difference between microbe and human NAD biosynthesis pathways. Biochemical transformations (arrows) directly involved in the biosynthesis. Functional roles in this subsystem (mostly enzymes) are shown by abbreviations in boxes. ADPRP, ADP-ribose pyrophosphatase (EC3. 6. 1. 13); ASPOX, L-aspartate oxidase (EC1. 4. 3. 16); NADK, NAD kinase (EC2. 7. 1. 23); NADS, NAD synthetase (EC6. 3. 1. 5); NAM, nicotinamidase (EC3. 5. 1. 19); NaMNAT, nicotinate nucleotide adenyltransferase (EC2. 7. 7. 18); NMNAT, nicotinamide nucleotide adenyltransferase (EC2. 7. 7. 1); NMPRT, (nicotinamide phosphoribosyltransferase (EC2. 4. 2. 12); PnuC, ribosyl nicotinamide transporter, PnuC-like; QPRT, quinolinate phosphoribosyl transferase (EC2. 4. 2. 19); QSYN, quinolinate synthetase (EC2. 5. 1. 72); RNK, ribosyl nicotinamide kinase (EC2. 7. 1. 22); TDO, tryptophan deoxygenase; KFA, kynurenine-formamidase; KMO, kynurenine -3-monooxygenase; KYN, kynureninase; HAD, 3-hydroxy -anthranilate 3,4-dioxygenase. Key metabolites (precursors and products) and intermediates are shown by abbreviations in circles. Asp, L-aspartate; Try, Tryptophane; VB<sub>3</sub>, nicotinamide; NADP, NAD phosphate; NmR, N-ribosyl nicotinamide; IA, iminoaspartate; QA, quinolinic acid; NaMN, nicotinic acid mononucleotide; NaAD, Nicotinic acid Adenine Dinucleotide; NA, nicotinic acid; NMN, nicotinamide mononucleotide; ADPr, ADP-ribose; RP, ribose phosphate; FK, N-formyl kynurenine; KY, kynurenine; HK, 3-hydroxy- kynurenine; HA, 3-hydroxyanthranilate; niaP/niaX/niaY, transporter.

## 1 NAD 合成酶的分类和催化反应

20 世纪 50 年代后期 NAD 合成酶活性首次见报道<sup>[14]</sup>。它催化 NAD 生物合成过程中最后一步反应:将 NaAD 转变为 NAD(图 2)。根据 NAD 合成酶对氨来源的偏好性的不同可以将其分为 2 类:氨 - 依赖型 NAD 合成酶和谷氨酰胺 - 依赖型 NAD 合成酶。前者只能完成直接以 NH<sub>3</sub> 作为氨源的反应  $\text{NaAD} + \text{NH}_3 + \text{ATP} \rightarrow \text{NAD} + \text{AMP} + \text{PP}_i$ , 它仅分布于原核生物;后者既可完成以 NH<sub>3</sub> 作为氨源的合成反应也可进行以谷氨酰胺作为氨源的反应,  $\text{NaAD} + \text{谷氨酰胺} + \text{ATP} \rightarrow \text{NAD} + \text{谷氨酸} + \text{AMP} + \text{PP}_i$ , 它分布于真核生物和部分原核生物, 如 *Mycobacterium*

*tuberculosis*。氨 - 依赖型 NAD 合成酶比谷氨酰胺依赖型 NAD 合成酶少谷氨酰胺酶和氨通道(如图 2)。Rizzi M 等人对 *Bacillus subtilis* NAD 合成酶催化反应的机制进行进一步研究,发现在 NAD 合成酶 - NAD - 腺苷复合物中有 2 个 NAD-腺苷和 2 个焦磷酸分子。新生的 NaAD - 结合位点和 ATP 结合位点处有一个 Mg<sup>2+</sup> 簇, 还有 2 个一价阳离子结合位点, 其中一个为氨结合位点。这表明 NAD 合成酶进行这 2 步不同的反应运用不同的催化策略:第 1 步腺苷酰化的催化作用并不由特定的氨基酸残基直接负责, 而是在活性位点的 3 个金属离子之间进行相互作用, 是电子传递辅助催化的。在第 2 步反应中 Asp<sup>173</sup> 是一个关键的残基, 在氨离子的去质子化和保

持稳定性的两个方面起主要作用,而产物的释放则是由 2 个柔性环构象的变化来控制的<sup>[15]</sup>。随后对这 2 个柔性环的研究,发现它们分别是可变环 82 - 87 和 204 - 225。这两个环的稳定均不依赖 NaAD,而且独立于 ATP - 结合位点。其中,小环 82 - 87 较稳定,通过与 ATP 的腺苷基相互作用形成氢键。大环 204 - 225 主要参与底物识别,保持稳定性以及保

护反应进程<sup>[16]</sup>。这种催化反应过程广泛存在于氨依赖型和谷氨酰胺依赖型 NAD 合成酶中。而谷氨酰胺依赖型 NAD 合成酶还有一个谷氨酰胺酶催化结构域,他将谷氨酰胺转变成为氨和谷氨酸,氨通过 2 个结构域中间的氨运运送到 NAD 合成酶结构域部分(如图 2)。

表 1 NAD 合成酶和关键作用残基

Table 1 NAD synthetase and their key residues

Classification	Comparison	Subunits	Ammonia resource	Key residue	Ref.
NH3-dependence NAD synthetase	<i>B. subtilis</i>	2	NH3	Asp <sup>173</sup> , Arg <sup>82</sup> -Gln <sup>87</sup> and His <sup>204</sup> -Glu <sup>225</sup>	[9]
	<i>E. coli</i>	2	NH3	Phe <sup>170</sup> and Asp <sup>224</sup> -Gln <sup>228</sup>	[10]
	<i>H. pylori</i>	2	NH3	Ser <sup>33</sup> , Leu <sup>36</sup> , Ser <sup>38</sup> , Phe <sup>246</sup> , Leu <sup>128</sup> , and Ala <sup>88</sup> - Ala <sup>102</sup>	[10]
Glutamine-dependence NAD synthetase	<i>Homo sapiens</i> NADSYN2	2	NH3	Ser <sup>97</sup> -Ser <sup>103</sup>	[11]
	<i>M. tuberculosis</i>	8	NH3 and Glutamine	Cys <sup>176</sup> , Glu <sup>52</sup> and Lys <sup>121</sup>	[12, 13]
	<i>Homo sapiens</i> NADSYN1	6	NH3 and Glutamine	Glu <sup>45</sup> , Lys <sup>114</sup> , and Cys <sup>176</sup>	[11]

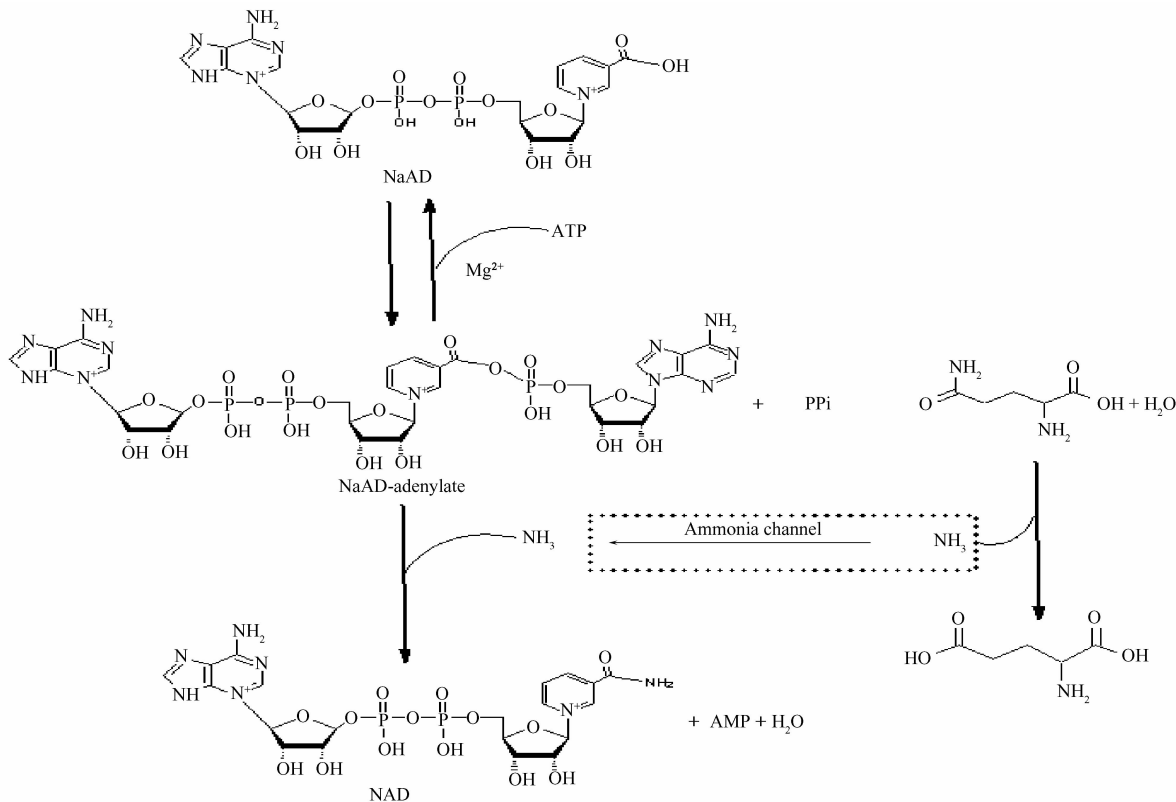


图 2 NAD 合成酶催化

Fig. 2 The catalytic reaction of NAD synthetase.

人类的 NAD 合成酶就包含 2 类 NAD 合成酶: NADsyn1 和 NADsyn2。对小鼠的研究发现, NADsyn1 在小肠,肝脏,肾和睾丸中表达量高,而在骨骼肌和心脏中却很低。而 NADsyn2 在所有组织中均有表达。对 NADsyn1 和 NADsyn2 的生化试验

研究表明:两者均有 NAD 合成酶活性;NADsyn1 可以利用谷氨酰胺和氨作为氨供体,而 NADsyn2 只能依赖氨,这也是在真核生物找到的唯一的氨依赖型合成酶;用 Ser 代替 NADsyn1 中的谷氨酰胺酶结构域中 Cys<sup>175</sup>时,NADsyn1 就不能利用谷氨酰胺<sup>[11]</sup>。

结核分枝杆菌中 MTCY428.08 基因编码的产物是 NAD 合成酶,它可以利用谷氨酰胺和氨,但主要利用谷氨酰胺。早期对结核分枝杆菌的 NAD 合成

酶的研究表明谷氨酰胺的消耗超过 NAD 产出的 40%,后来 Wojcik M 等人揭示 NAD 合成酶的谷氨酰胺酶活性由 NaAD 激活的,在 NaAD 缺少时就没

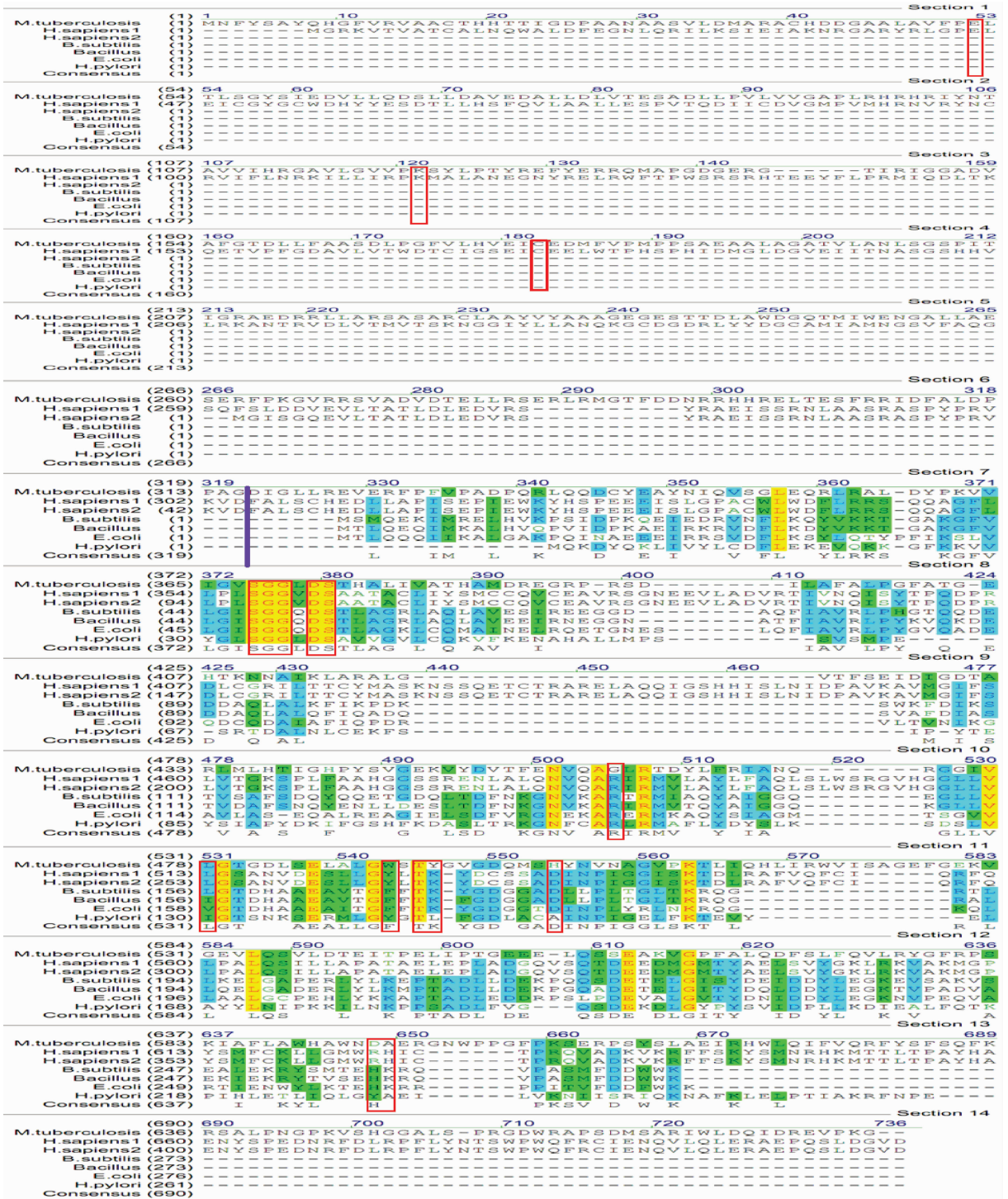


图3 几种 NAD 合成酶一级结构比对结果

Fig. 3 The comparison of primary structure of several NAD synthetases. The purple vertical line is the demarcation between glutaminase and NAD synthetases segment. The residues in the red boxes are the key residues for glutaminase or NAD synthetases.

有明显的谷氨酰胺消耗。在整个谷氨酰胺和 NaAD 底物浓度的范围之内,就会有谷氨酰胺消耗超过 NAD 产出的现象,且尤以两者饱和之时最为显著<sup>[8]</sup>。根据对结核分枝杆菌 NAD 合成酶的动力学和晶体结构特征的研究,揭示了其同源 8 聚体结构,其四级结构与催化活性紧密相关,其中包含一个约 40Å 的沟通谷氨酰胺酶结构域和 NAD 合成酶结构域的氨通道,它可能涉及到催化位点之间的信号传递<sup>[12]</sup>。NAD 合成酶的 N-末端结构域是催化谷氨酰胺水解的中心。通过定点突变用 Ala 代替催化 3 组件 Cys<sup>176</sup>, Glu<sup>52</sup> 和 Lys<sup>121</sup>, 结果 3 个突变体的 NAD 合成酶的谷氨酰胺酶活性完全丢失。另外, Cys<sup>176</sup> 和 Glu<sup>52</sup> 的变异,分别保持了原来氨-依赖型特异性活性的 90% 和 30%, 而 Lys<sup>121</sup> 突变丢失所有的活性。这个结果表明 Cys<sup>176</sup>, Glu<sup>52</sup> 和 Lys<sup>121</sup> 在保持 NAD 合成酶催化活性中至关重要<sup>[13]</sup>。这也为以结核分枝杆菌的 NAD 合成酶为药物靶标的新型药物开发提供基础理论依据。在构建药物化学骨架时这些重要的氨基酸残基是重要考虑的内容。

## 2 NAD 合成酶的调节

目前对 NAD 生物合成途径的调控机制了解的还比较少,现在已有 3 个调节子 NadR<sup>[17]</sup>、NiaR<sup>[18]</sup> 和 NrtR<sup>[19]</sup> 见报道。而且目前针对 NAD 合成酶进行转录调控的仅有 NrtR 家族。

NrtR 家族存在于绝大多数细菌中,它能够调节多种生化反应过程,包括利用戊糖和磷酸核糖焦磷酸(PRPP)的生物发生,PRPP 是核苷酸和氨基酸合成的重要前体<sup>[19]</sup>。Shewanella oneidensis 基因组含有一个 nrtR-nadV-prs 转录单元区域。其中, nadV 是烟酰胺磷酸核糖转移酶,催化 PRPP 的磷酸核糖基到烟酰胺上形成烟酰胺单核苷酸, prs 是核糖磷酸焦磷酸激酶用于合成磷酸核糖焦磷酸(PRPP)。soNrtR 的晶体结构包含 2 个结构域: N-末端的 Nudix 水解酶样结构域和 C-末端的 wHTH 形 DNA 结合结构域。NrtR 的 DNA 结合位点包括 10 个关键氨基酸残基与 DNA 操纵子位置的 ATA-n2-GT 盒子结合。其中 4 个残基(Gln<sup>189</sup>, Lys<sup>191</sup>, Ser<sup>192</sup> 和 Arg<sup>195</sup>)用于 DNA 识别和相互作用; 5 个残基(Leu<sup>161</sup>, Leu<sup>176</sup>, His<sup>180</sup>, Phe<sup>193</sup> 和 Leu<sup>203</sup>)形成 wHTH 结构域的疏水核心; 还有 Leu<sup>145</sup> 用于连接 wHTH 和 Nudix 结构域<sup>[20]</sup>。电泳迁移率变动分析(EMSA)实验确定了

Synechocystis sp. NrtR 结合 nadE, nadMV 和 nadA<sup>[19]</sup>。在细菌细胞中高水平的 ADPr 能通过抑制 NrtR 的功能,作为 NAD 生物合成基因表达活化的信号。对比复合 DNA 和 ADPr 的 NrtR 的晶体结构发现 Nudix 结构域在变构调节 DNA 结合中可能有关键性作用<sup>[20]</sup>。对于 NrtR 的研究也是刚刚起步,尤其是在致病菌中的研究还很缺乏信息,但对于揭示 NAD 生物合成代谢却有十分重要的意义,未来的研究将着眼于对其调控机制的阐释。

非编码小 RNA(sRNAs)调节 E. coli, Pseudomonas aeruginosa 和 Listeria monocytogenes 等细菌中的许多基因的表达。在 E. coli 中几个 sRNAs 球型调节子通过结合到 mRNAs 上起作用的。在高水平 cAMP 状态下球型调节子 Crp 能够正调控 CyaR。而 CyaR 又负调控一些基因,包括 ompX 编码一个主要的外膜蛋白; lux 编码自身诱导-2 合成酶; nadE 编码的重要 NAD 合成酶和 ypaE 编码一个功能未知的膜蛋白<sup>[21]</sup>。非编码小 RNA(sRNAs)对于生物体全局性调节被受各界研究者的关注,这里其对于 NAD 合成酶的调控也暗示了其在细胞生理调控方面的重要作用。由此我们还说明 NAD 合成酶的表达是受到多重调控子共同调控的。

## 3 基于 NAD 合成酶晶体结构的抑制剂设计

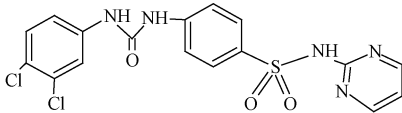
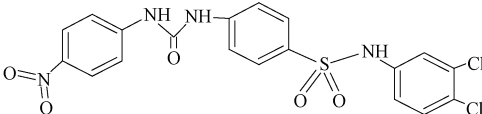
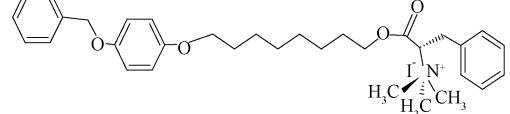
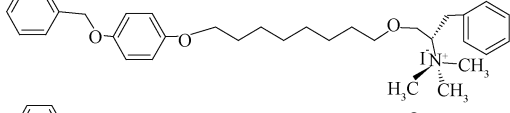
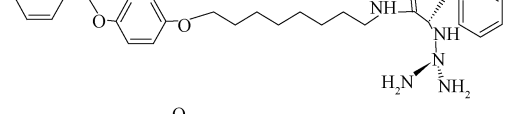
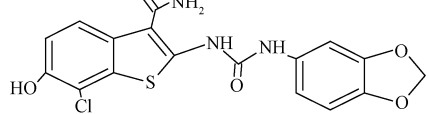
基于晶体结构的药物设计领域是一个快速增长的领域,最近几年有很多成果产生,它主要包括靶标的选择,靶标的晶体结构的评价,药物发掘的方法的选择和药物的评价 4 个方面。首批的 NAD 合成酶抑制剂是由天然  $\alpha$ -氨基酸末端加入栓系二聚体的合成化合物组成的,包括 2 个疏水基团与聚亚甲基链相连接,还有一个在末端的带正电荷的氮原子(表 2)。早期的活化的二聚体包含由 6-9 个碳聚亚甲基栓系连接的吡啶末端基团和一个带正电荷的另一末端两个部分。它对革兰氏阳性菌包括耐抗生素的抗性菌株有抑制活性,但对革兰氏阴性菌无效<sup>[22]</sup>。后来用苯基环代替吡啶,一般的结论是非极性取代物比极性的酶抑制活性更有效而且不同位置异构物差异很大,但他们发现 NAD 合成酶的活性对于这个小的非特殊性去垢剂活性的结构变化并不是太敏感<sup>[23]</sup>。但是后来发现这类药物特征使得其对细胞有毒性,所以其开发前景不容乐观<sup>[24]</sup>。根据

对 NAD 合成酶的晶体结构的解析知识,研究者进行了针对 NAD 合成酶抑制剂的研究设计。Moro WB 等人就利用虚拟模型筛选程序 FlexX1. 20. 1 联合 CScore 针对 NAD 合成酶的活性位点筛选抑制剂。筛选出的化合物的  $IC_{50}$  值定义为受抑制的 NAD 合成酶催化产生的 NAD 峰高与未受抑制的之比为 50% 时的抑制剂的浓度。每种化合物的  $IC_{50}$  值为 2 次测试的平均值。将 200 余种化合物用于酶抑制和抗菌试验,筛选得到 18 种对 *B. anthracis* 和 *B. subtilis* 的 NAD 合成酶有抑制作用而且化合物浓度低于  $100 \mu\text{M}$ 。其中 2 个化合物 5617 和 5824(表 2)均包含 3 个芳香基并由一个尿素和一个磺酰胺连接,而且都有一个 3,4-二氯苯基环。它们能够对 NAD 合成酶和 *B. anthracis* 均有良好活性,因此被选作进一步构效关系方面的研究<sup>[25]</sup>。*B. Hegymegi-Barakonyi* 等利用 Nested Chemical Library™ (NCL) 和药效基团修饰对结核分枝杆菌中涉及到细菌和宿主细胞信号的几个靶标分子,如: Ser/Thr 蛋白激酶, PknB 和

PknG, NAD 激酶和 NAD 合成酶进行了虚拟药物设计和筛选。对经典的 4,5,6,7-Tetrahydrobenzo[ b ] thiophene 系列的基团进行修饰,产生了一系列的对 PknG 有抑制作用的化合物。但是除 VI-16315 外其余化合物均具有细胞毒性,而且 VI-16315 是一个潜在多靶标抑制剂,其对 PknG, NADS 和 NADK 均有抑制作用。但是由于 VI-16315 的药物效能比较差,所以它还不是最优的临床抑制剂,需要进一步改善效能<sup>[26]</sup>。但这些候选抑制剂还未见有进行动物实验和临床试验的报道,原因可能包括这些小分子抑制剂在体外有较明显的抗菌效果,但在体内可能被迅速降解等因素,而在体内试验中效果不佳,也可能是药物本身的性质还未能够达到进入临床的要求,比如对细胞有毒性或者不易被消化吸收进入体内。

基于靶标晶体结构的抑制剂设计是研究与开发新药的一种崭新技术,它必将大大缩短新药设计研发周期,节省人力物力,药物学家依靠基础理论作为指导,有目的地进行新药研发。

表 2 以 NAD 合成酶为靶标的药物设计  
Table 2 Drugs design based on NAD synthetase

Drug name	Chemical structural formula	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Species	Ref.
5617		77.5	<i>Bacillus anthracis</i>	[25]
5824		10	<i>Bacillus anthracis</i>	[25]
Tethered Dimer 2a		22	<i>Bacillus subtilis</i>	[24]
Tethered Dimer 11b		21	<i>Bacillus subtilis</i>	[24]
Tethered Dimer 13a		12	<i>Bacillus subtilis</i>	[24]
VI16315		55	<i>M. tuberculosis</i>	[26]

## 4 展望

随着生物信息学、功能基因组学、功能蛋白质组学的快速发展,必将为新型药开发提供更多的潜在药靶。对 NAD 生物合成途径中重要靶标酶 NAD 合成酶从功能,晶体结构,调节以及针对靶标的抑制剂的探索,为今后的研究提供一些思路和方法。未来的研究方向应该主要集中在筛选出更多 NAD 合成酶抑制剂,以及对他们进行体内体外的毒理实验。

## 参考文献

- [ 1 ] Sander C, McShane H. Translational mini-review series on vaccines: Development and evaluation of improved vaccines against tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 2007, 147: 401-411.
- [ 2 ] Smith C. Drug target identification: a question of biology. *Nature*, 2004, 428: 225-231.
- [ 3 ] Magni G, Di Stefano M, Orsomando G, Raffaelli N, Ruggieri S. NAD(P) biosynthesis enzymes as potential targets for selective drug design. *Current Medicinal Chemistry*, 2009, 16: 1372-1390.
- [ 4 ] Romero P, Wagg J, Green ML, Kaiser D, Krummenacker M, Karp PD. Computational prediction of human metabolic pathways from the complete human genome. *Genome Biology*, 2005, 6: R2.
- [ 5 ] Belenky P, Bogan KL, Brenner C. NAD<sup>+</sup> metabolism in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 2007, 32: 12-19.
- [ 6 ] Boshoff HI, Xu X, Tahlan K, Dowd CS, Pethe K, Camacho LR, Park TH, Yun CS, Schnappinger D, Ehrst S, Williams KJ, Barry CE. Biosynthesis and recycling of nicotinamide cofactors in mycobacterium tuberculosis. An essential role for NAD in nonreplicating bacilli. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283: 19329-19341.
- [ 7 ] Sorci L, Martynowski D, Rodionov DA, Eyobo Y, Zogaj X, Klose KE, Nikolaev EV, Magni G, Zhang H, Osterman AL. Nicotinamide mononucleotide synthetase is the key enzyme for an alternative route of NAD biosynthesis in *Francisella tularensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106: 3083-3088.
- [ 8 ] Wojcik M, Seidle HF, Bieganski P, Brenner C. Glutamine-dependent NAD<sup>+</sup> synthetase. How a two-domain, three-substrate enzyme avoids waste. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281: 33395-33402.
- [ 9 ] Markus MA, Doliveira L, Malakian K, Keeney D, Severin A, Underwood KW, Tsao DH. 1H, 13C, and 15N backbone assignments and secondary structure for the 60.8 kD dimer of the NAD<sup>+</sup> synthetase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biomolecular NMR*, 2004, 28: 301-302.
- [ 10 ] Jauch R, Humm A, Huber R, Wahl MC. Structures of *Escherichia coli* NAD synthetase with substrates and products reveal mechanistic rearrangements. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 15131-15140.
- [ 11 ] Hara N, Yamada K, Terashima M, Osago H, Shimoyama M, Tsuchiya M. Molecular identification of human glutamine and ammonia-dependent NAD synthetases. Carbon-nitrogen hydrolase domain confers glutamine dependency. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 10914-10921.
- [ 12 ] LaRonde-LeBlanc N, Resto M, Gerratana B. Regulation of active site coupling in glutamine-dependent NAD(+) synthetase. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, 16: 421-429.
- [ 13 ] Bellinzoni M, Buroni S, Pasca MR, Guglielame P, Arcesi F, De Rossi E, Riccardi G. Glutamine amidotransferase activity of NAD<sup>+</sup> synthetase from *Mycobacterium tuberculosis* depends on an amino-terminal nitrilase domain. *Research in Microbiology*, 2005, 156: 173-177.
- [ 14 ] Preiss J, Handler P. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. I. Identification of intermediates. *Journal of Biological Chemistry*, 1958, 233: 488-492.
- [ 15 ] zzi M, Bolognesi M, Coda A. A novel deamido-NAD<sup>+</sup>-binding site revealed by the trapped NAD-adenylate intermediate in the NAD<sup>+</sup> synthetase structure. *Structure*, 1998, 6: 1129-1140.
- [ 16 ] Devedjiev Y, Symersky J, Singh R, Jedrzejewski M, Brouillette C, Brouillette W, Muccio D, Chattopadhyay D, DeLucas L. Stabilization of active-site loops in NH<sub>3</sub>-dependent NAD<sup>+</sup> synthetase from *Bacillus subtilis*. *Acta Crystallographica Section d-biological Crystallography*, 2001, 57: 806-812.
- [ 17 ] Grose JH, Bergthorsson U, Roth JR. Regulation of NAD synthesis by the trifunctional NadR protein of *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187: 2774-1782.
- [ 18 ] Rodionov DA, Li X, Rodionova IA, Yang C, Sorci L, Dervyn E, Martynowski D, Zhang H, Gelfand MS, Osterman AL. Transcriptional regulation of NAD metabolism in bacteria: genomic reconstruction of NiaR (YrxA) regulon. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36: 2032-

- 2046.
- [19] Rodionov DA, De Ingeniis J, Mancini C, Cimadamore F, Zhang H, Osterman AL, Raffaelli N. Transcriptional regulation of NAD metabolism in bacteria; NrtR family of Nudix-related regulators. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36: 2047-2059.
- [20] Huang N, De Ingeniis J, Galeazzi L, Mancini C, Korostelev YD, Rakhmaninova AB, Gelfand MS, Rodionov DA, Raffaelli N, Zhang H. Structure and function of an ADP-ribose-dependent transcriptional regulator of NAD metabolism. *Structure*, 2009, 17: 939-951.
- [21] De Lay N, Gottesman S. The Crp-activated small noncoding regulatory RNA CyaR ( RyeE ) links nutritional status to group behavior. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191: 461-476.
- [22] Velu SE, Cristofoli WA, Garcia GJ, Brouillette CG, Pierson MC, Luan CH, DeLucas LJ, Brouillette WJ. Tethered dimers as NAD synthetase inhibitors with antibacterial activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2003, 46: 3371-3381.
- [23] Velu SE, Luan CH, DeLucas LJ, Brouillette CG, Brouillette WJ. Tethered dimer inhibitors of NAD synthetase; parallel synthesis of an aryl-substituted SAR library. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 2005, 7: 898-904.
- [24] Velu SE, Mou L, Luan CH, Yang ZW, DeLucas LJ, Brouillette CG, Brouillette WJ. Antibacterial nicotinamide adenine dinucleotide synthetase inhibitors; amide- and ether-linked tethered dimers with alpha-amino acid end groups. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2007, 50: 2612-2621.
- [25] Moro WB, Yang Z, Kane TA, Brouillette CG, Brouillette WJ. Virtual screening to identify lead inhibitors for bacterial NAD synthetase ( NADs ). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 19: 2001-2005.
- [26] Hegymegi-Barakonyi B, Szekely R, Varga Z, Kiss R, Borbely G, Nemeth G, Banhegyi P, Pato J, Greff Z, Horvath Z, Meszaros G, Marosfalvi J, Eros D, Szantai-Kis C, Breza N, Garavaglia S, Perozzi S, Rizzi M, Hafenbradl D, Ko M, Av-Gay Y, Klebl BM, Orfi L, Keri G. Signalling inhibitors against Mycobacterium tuberculosis—early days of a new therapeutic concept in tuberculosis. *Current Medicinal Chemistry*, 2008, 15: 2760-2770.

## Microbial NAD synthetase and its inhibitors-A review

Jicai Bi<sup>1</sup>, Honghai Wang<sup>2</sup>, Jianping Xie<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Modern Biopharmaceuticals, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

**Abstract:** Nicotinamide-adenine dinucleotide (phosphate) (NAD(P)) metabolism involves many fundamental cellular events, such as energy metabolism, maintenance of redox homeostasis and regulation of cell longevity. Inhibitors of essential enzymes of NAD(P) biosynthetic pathways might be promising leads for novel antibiotics, such as the NAD synthase inhibitors. This review described the crystal structural, functional properties, regulator and structure-based inhibitors design for NAD synthase. This might provide the basis for developing NAD-based therapeutics.

**Keywords:** NAD synthetase; crystal structural, structure-based inhibitors design, NrtR family

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Key Infection Disease Project (2008ZX10003-006, 2008ZX10003-001)

\* Corresponding author. Tel: +86-23-68367108; Fax: +86-23-68252365; E-mail: georgex@swu.edu.cn, jianpingxie@fudan@gmail.com

Received: 21 July 2010 / Revised: 22 September 2010