

力复霉素生物合成中间体 A-32 的生物学特性与结构的研究

金志坤 刘慈俊 陈平 李述文
陆小燕 魏中教 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

汪 聪 慧

(燕京科学技术服务公司, 北京)

本文报道了地中海诺卡氏菌 *Nocardia mediterranei* 经诱变育种获得的两株无活力菌株 (rif1、rif2), 能经共合成产生力复霉素, 即其中供体菌株 rif1, 在发酵液中累积一个中间体 A-32, 能被另一个无活力菌株 rif2 转化为力复霉素^[1,2]。此中间体 (A-32) 经分离纯化, 理化性质和生物活性研究以及 IR、NMR、MS 的光谱测定, 确证 A-32 结构为 3-羟基-5-氨基苯甲酸 (简称 A-32), 这与 Kibby 等^[3]推测中间体 C₇N 的化学结构是相同的物质, 从而证明了化合物 C₇N 是力复霉素的一个天然中间体。

关键词 力复霉素; 生物合成中间体; 特性; 结构

White 等应用同位素示踪方法明确了力复霉素分子中除芳香部分以外的全部碳原子的生源^[4]。Ghisalba 等采用突变株证明力复霉素芳香部分是经过莽草酸代谢途径而来^[5]。但是已获得的力复霉素生物合成途径的中间产物为数不多, 到目前为止, 从突变株中分离到的中间体或支路产物仅有力复霉素 W^[6]、原力复霉素 (Protorifamycin I)^[7]、P8/1-OG 及 P8/1-OG 内酯^[8]。本文报道 A-32 中间体的分离、理化性质、生物活性和结构的研究结果。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

菌株 rif1 和 rif2 都是地中海诺卡氏菌 (*Nocardia mediterranei*) U32 经诱变获得的无活力突变株。rif1 和 rif2 两者有共合成能力, rif1 分泌一个中间 A-32, 能被 rif2 转化为力复霉素^[1,2]。

(二) 培养基及培养条件

同以前报道^[1]。

(三) A-32 中间体含量测定

用琼脂块法测定, 见以前报道^[9]。

(四) 薄层层析

用 E. Merck 厂生产薄层层析用硅胶 60G。溶剂系统 (I) 氯仿: 甲醇 (8:2); (II) 乙酸乙酯: 甲醇: 苯 (15:5:3)。

(五) 结构分析采用仪器和实验条件

紫外吸收光谱用岛津 UV-90 型分光光度计测定。红外吸收光谱用岛津 IR-400 型红外分光光度计, KBr 压片测定。¹H-核磁共振谱用 JOEL-PL100 型核磁共振仪测定。荧光光谱使用岛津

本文于 1982 年 9 月 26 日收到。

注: 郭荷女同志参加部分技术工作。上海第一医学院药系褚志义同志, 中国科学院上海药物化学研究所翁尊尧教授、黄知恒教授对本工作提出了宝贵意见; 中国科学院上海有机化学研究所傅瑶红同志帮助测定荧光光谱, 本所邵大森、满纪生、刘春铭三同志帮助测定高压液相色谱和紫外光谱, 谨此一并致谢。

本文承上海有机化学研究所周维善教授审阅特此致谢。

RF-502 型分光光度计。质谱由 Varian-MAT731 型质谱仪测得。化学合成 3-羟基 5-氨基苯甲酸与 A-32 中间体的电子电离谱(EI)轰击电子能量 100eV, 电子发射 0.8mA, 在分辨率 R 为 1000 (各 10%)的条件下获得低分辨谱图。R 为 10,000 时使用峰匹配法测得离子的精确质量, 测定精度 < 1ppm, 使用直接进样系统, 源温 150℃, 样品蒸发温度在棒图中注明, 由 VG-70-70 质谱仪获得 A-32 中间体样品的解吸化学电离图(DCI), 分辨率 R 为 800 (各 10%), NH₃ 为反应气。高压液相层析为日立-638-0500 高压液相色谱仪, 柱: $\phi 2.6 \times 500\text{mm}$ (3050 担体), 柱温 27℃, 压力 93kg/cm², 流量 1.0ml/min, 流动相: 甲醇: 0.01M 磷酸氢二钾 (80:30)。

(六) 样品与试剂

力复霉素 W 样品由意大利 Lepetit 实验室 G. G. Gallo 博士赠送。原力复霉素 I 样品系由瑞士 Ciba-Geigy 公司研究室 J. Nüschi 博士赠送。天青霉素 (Cerulenin) 样品系由日本北里大学大村智教授赠送。其他化学试剂均为化学纯药品。

实验结果与讨论

(一) A-32 中间体的分离纯化

A-32 中间体为一极性很强的水溶性物质, 在 UV₂₅₄ 灯下有蓝紫色荧光, 水溶液在空气中很不稳定。经过实验, 我们确定用乙酸乙酯进行抽提。先从发酵液除去菌体, 所得上清液用盐酸调节 pH 至 3, 再用乙酸乙酯抽取 (每次用量为 20% 发酵液体积, 共抽三次)。有机相用饱和氯化钠水洗后, 低温减压浓缩, 得棕褐色干粉。再用乙醚溶解, 弃去不溶物, 在低温蒸去乙醚, 有米黄色沉淀析出, 过滤, 用乙酸乙酯洗涤, 即得米黄色粗品。纯品可在甲醇-乙酸乙酯中重结晶制得。或者将粗制品在制备性硅胶 G 薄板上层析纯化二次, 层析系统为乙酸乙酯: 甲醇: 苯 (15:5:3)。A-32 纯品呈浅黄色, 熔点区间 202—204℃。

(二) A-32 的理化性质及其与力复霉素 W (简称 W) 和原力复霉素 (简称

Pro) 的比较

A-32 溶于水、甲醇等极性溶剂, 但微溶或不溶于苯等非极性溶剂。W 与 Pro 则溶于苯、氯仿等溶剂。从表 1 中 A-32、W 和 Pro 在硅胶 G 薄层层析板上, 用两种不同溶剂系统中的 R_f 值, 可以明显看出它们之间的区别。A-32 在不同酸碱度下的最大紫外吸收峰 (表 2) 也表明它与 W 和 Pro 的紫外特征吸收峰有明显的区别^[4]。再者, 从表 2 中 A-32 在不同 pH 溶液中紫外吸收峰的色带移动情况来看, 它很可能是一个含有 -OH 和 -NH₂ 等助色基团的芳香取代衍生物。

A-32 在紫外光照射下能产生很强的蓝紫色荧光, 经测定, 当激发光波长 (λ_{ex}) 为 320nm, 发射光波长 (λ_{em}) 为 410nm。W 和 Pro 则都不能受激发而发射荧光。

(三) A-32 的生物学特性

A-32 中间体对八叠球菌无抑菌活性, 但能被无活力突变株 rif² 转化为力复霉素, 经共合成后产生的力复霉素和标准力复霉素 SV 的红外图谱相同 (图 1), 说明共合成产物是力复霉素 SV。

力复霉素 W 和原力复霉素 I 本身对八叠球菌都无抑菌活性, 但 W 被突变株 rif² 转化后的产物有较低的活力, 而原力复霉素则不能被转化为活性物质 (图 2 第 II 行)。这一结果表明 A-32 不仅在化学上, 而且在生物学特性上都与已知的力复霉素生物合成中间体 W 和 Pro 不同。

另外, 我们又将能抑制多酮链 (Polyketide) 合成的天青霉素 Cerulenin^[9] 加入到 rif¹ 发酵液中, A-32 的产生并不受到抑制。但是同样浓度的天青霉素则抑制原种的力复霉素 SV 的产量达 80%。在 rif² 琼脂块转化时加入天青霉素, 也明显抑制 A-32 的转化为力复霉素。图 2 第 C₁、C₂ 列表示 rif² 对 A-32、Pro 和 W 在天青霉素

表 1 A-32、力复霉素 W 和原力复霉素 I 在不同溶剂系统中薄层层析的 R_f 值

Table 1 R_f values of TLC of A-32, rifamycin W and protorifamycin I in different solvent systems

样品 sample	A-32	力复霉素 W rifamycin W	原力复霉素 I protorifamycin I
溶剂系统 solvent systems			
氯仿:甲醇 chloroform-methanol (8:2)	0.27	0.76	0.79
乙酸乙酯:甲醇:苯 ethyl acetate-methanol-benzene (15:5:3)	0.15	0.61	0.58

存在下的转化活力,由第 C₁ 列可以看出加入 3.2μg/琼脂块的天青霉素对 A-32 的转化略有抑制,第 C₂ 列当天青霉素的量为 6.4μg/琼脂块时,抑制就很明显。以上结果表明,A-32 是一个分子量较小的,无多

表 2 A-32、力复霉素 W 和原力复霉素 I 的紫外吸收

Table 2 Ultraviolet spectra of A-32, rifamycin W and protorifamycin I

样品 samples	溶剂 solvents	吸收带 (nm) absorption band
A-32	0.1N HCl	207(28600), 231(5000), 294(3100)。
	0.1N NaOH	218(24900), 230(肩)(21300), 320(2400)。
	0.2M pH7.0 磷酸缓冲液 phosphate buffer	208(2700), 220(肩)(21500), 303(2300)。
力复霉素 W* rifamycin W*	0.1N NaOH	239,350,540。
原力复霉素 I* protorifamycin I*	0.1N NaOH	299, 390, 548, 600(580)。

* 见文献[4]

* see reference [4]

酮支链的苯环化合物。因为分子中无多酮

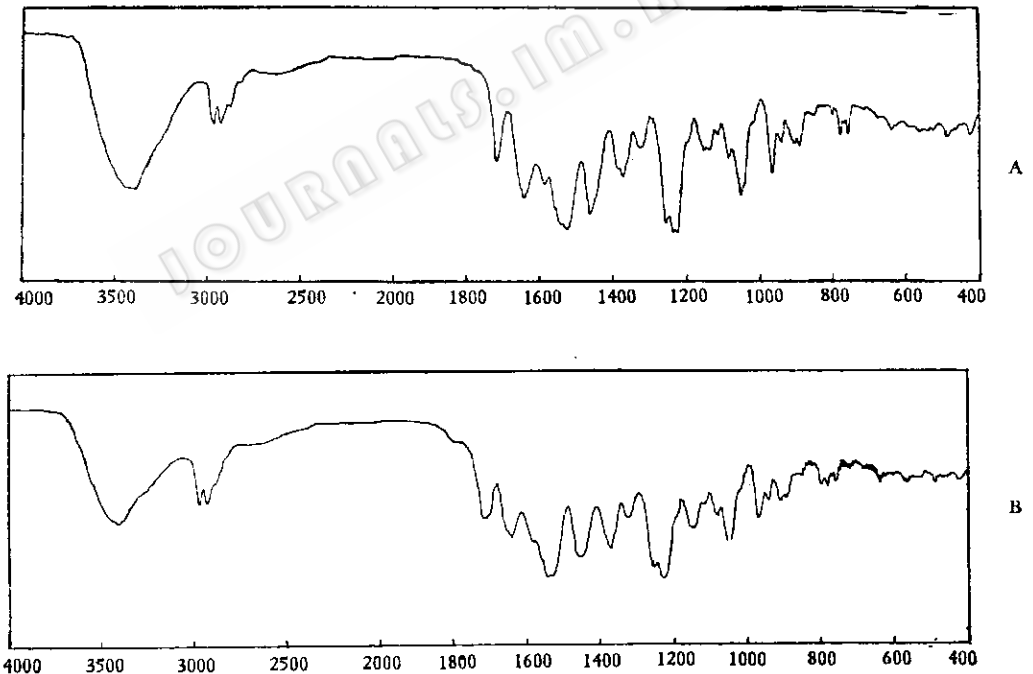


图 1 由 rif1 和 rif2 共合成产生的力复霉素与力复霉素 SV 标准样品红外图谱比较
Fig. 1 Comparison of infrared spectrum of rifamycin SV and of rifamycin from rif1 x rif2 cosynthesis

A: 力复霉素 SV Rifamycin SV B: rif1 和 rif2 共合成产生的力复霉素
Rifamycin from rif1 x rif2 cosynthesis

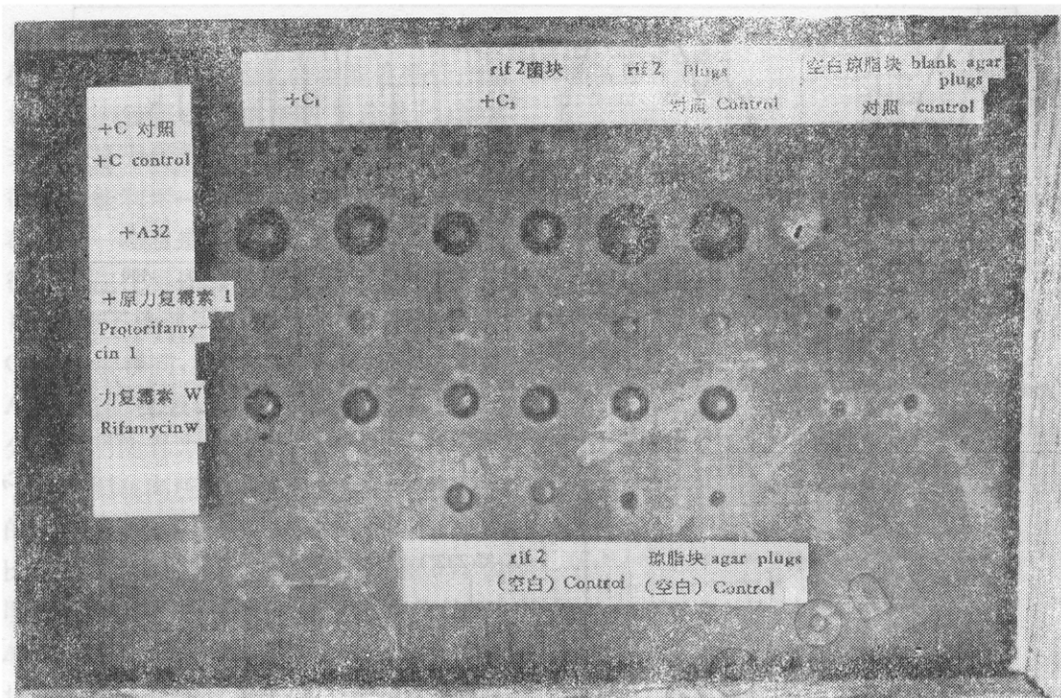


图2 天青霉素对 rif 2 菌株转化 A-32、原力复霉素 I 和力复霉素 W 的影响

Fig. 2 Effect of Cerulenin on conversion of A-32, Prototrifamycin I and rifamycin W by rif 2 mutant (中间体加样量为 $0.02\mu\text{g}/\text{块}$; 天青霉素 (C) 加样量 C_1 列为 $3.2\mu\text{g}/\text{块}$, C_2 列为 $6.4\mu\text{g}/\text{块}$) (intermediate addition: $0.02\text{g}/\text{plug}$, cerulenin addition C_1 : $3.2\mu\text{g}/\text{plug}$, C_2 : $6.4\mu\text{g}/\text{plug}$)

支链, 所以它的生物合成才不会受天青霉素的抑制; 而它的转化是从苯环上加接多酮链, 由于多酮链形成的聚合酶对天青霉素的抑制是敏感的, 所以突变株 rif2 对 A-32 的转化会受到抑制。此外, 我们也观察到化学合成的 C_7N 同样能由突变株 rif2 转化为力复霉素^[11]。这些证据完全支持了 A-32 结构分析所得的结论。

(四) A-32 的结构分析

在上述生物学特征基础上, 我们推测 A-32 可能为一个带有极性基团 ($-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_3$) 的苯环化合物, 我们进行了下列光谱分析。

由图 3DCI 谱可知 A-32 的 ($M + H$) 峰为 m/z 154、 m/z 171 为 $M + \text{NH}_4^+$ 、 m/z 110 为 ($M + H$)- CO_2 峰, 由此确定 A-32 的分子量为 153。

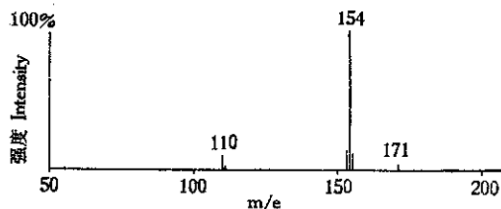


图3 A-32 的 DCI 谱

Fig. 3 Mass spectrum (Desorption Chemical Ionization) of A-32

NH_3 为反应气 Reagent gas: NH_3

从红外图谱 (图 4) 和核磁共振图谱 (图 5) 可以确定该化合物 (A-32) 含有一个三取代的苯环衍生物, 因 A-32 红外图谱在 1600 和 1430cm^{-1} 之间的吸收峰及低频波段指纹区的特征吸收峰 (795 和 760cm^{-1}) 均证明 A-32 为 1、3、5—三取代苯衍生物。其核磁共振谱在 $\delta 7.07$ — $\delta 7.4$ 有一组芳香质子峰, 积分曲线计算指

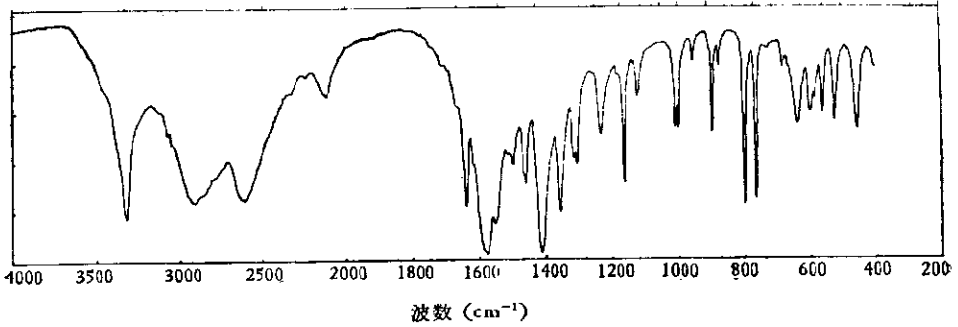
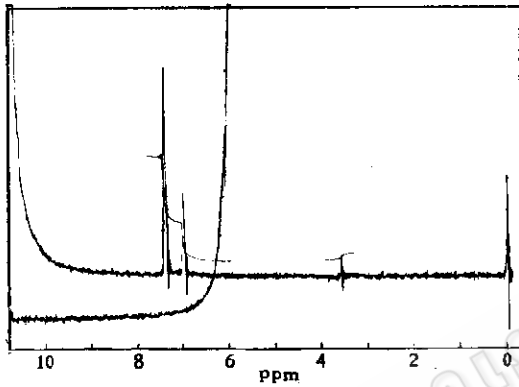
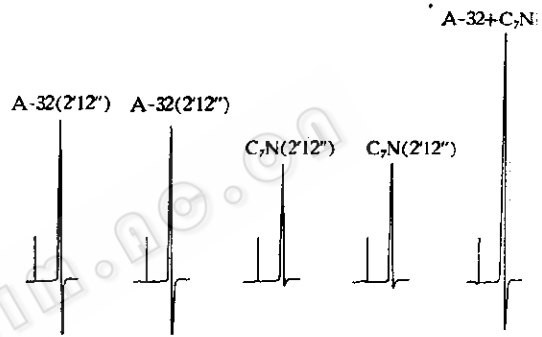


图4 A-32 红外线吸收光谱图 (KBr)

Fig. 4 Infrared spectrum of A-32 (KBr)

图5 A-32 的 ^1H 核磁共振谱(溶剂 F_3CCOOH)Fig. 5 ^1H -NMR spectrum of A-32 (solvent: F_3CCOOH)图6 C_7N 和 A-32 高压液相色谱图Fig. 6 HPLC of C_7N and A-32

(柱 $\phi 2.6 \times 500\text{mm}$ 3050 担体, 柱温 27°C , 流动相: 甲醇: $0.01\text{M KH}_2\text{PO}_4$, 80:20, 流量 $1.0\text{ml}/\text{分}$, 压力 93 公斤/平方厘米)

Column: $2.6 \times 500\text{mm}$, Temperature: 27°C Mobile phase: $\text{CH}_3\text{OH}-0.01\text{M KH}_2\text{PO}_4$ (80:2) Flow-rate: $1.0\text{ml}/\text{min}$, Column pressure: $93\text{kg}/\text{cm}^2$

出其质子数为 3 (图 5)。

在 3300cm^{-1} 具有一个相当强的吸收峰指出存在着 ν_{OH} 伸展吸收峰。另外, FeCl_3 化学定性分析方法也表明 A-32 有羟基存在。

ν_{OH} 2900cm^{-1} 有一个羧酸羟基峰, $\nu_{\text{C=O}}$ 1570cm^{-1} 有一个强吸收峰, 在 DCI 谱 m/z 110 为 $(\text{M} + \text{H})-\text{CO}_2$ 峰, 故 A-32 有羧基存在。

δ_{NH} 1510cm^{-1} 有一个弱峰及 1350cm^{-1} 为芳香族胺的 $\nu_{\text{N-H}}$ 振动, 说明有氨基存在。

根据上述光谱结果, 可以推测 A-32 为 3-羟基-5-氨基苯甲酸, 其分子量为 153, 和 DCI 谱测得的质子化分子离子峰 154 相符。

应用同位素示踪的生源研究证明有多种抗生素如力复霉素、曲张链丝菌素等均含有相同的芳香部分 C_7N ^[4,12]。最近澳大利亚工作者根据抗生素结构推测 C_7N 的结构为 3-羟基-5-氨基苯甲酸, 合成了 ^{14}C 标记的这一化合物, 并证明它能参入海霉素 (Actamycin)^[3]。瑞士工作者从无活力的代谢物 P8/1-OG 及 P8/1-OG 内酯的结

构推断 C_7N 的结构为 3-羟基-5-氨基苯甲酸, 并观察到合成的化合物能促进低产菌株合成力复霉素。这指明 3-羟基-5-氨基苯甲酸是力复霉素的前体的可能^[6]。但是微生物能利用一种化学物质, 还不能最后确定这一物质是生物合成的中间体, 因为微生物往往将外源物质先经转化再行利用。为了确证 A-32 中间体与化学合成 C_7N 是否相同, 我们对化学合成的 C_7N 与 A-32 进行比较, 经过质谱、高压液相色谱分析证明两者为同一化合物。

我们在高压液相色谱分析中, 将合成的 3-羟基-5-氨基苯甲酸与 A-32 进行对比, 发现其相对保留值完全相同(图 6), 说明 C_7N 和 A-32 为同一化合物。此外, 对 A-32 和 C_7N 在同一条件下做质谱(EI), 也得到相同的图谱(图 7)。在图谱上均有 m/z 153 的分子离子峰 M^+ 及 m/z 136、 m/z 125、 m/z 108、 m/z 96 等碎片离子峰, 它们分别来自: (见化学结构图)

微小的差异主要在 m/z 96 处, 前者低于后者。经高分辨质谱 m/z 96 由两种离子组成, 即 $C_6H_6NO^+$ (实验值 96.0450, 理论值 96.045) 和 $C_6H_6N^+$ (实验值 96.0814, 理论值 96.0813), 80°C 时 $C_7HNO/C_6H_{10}N$

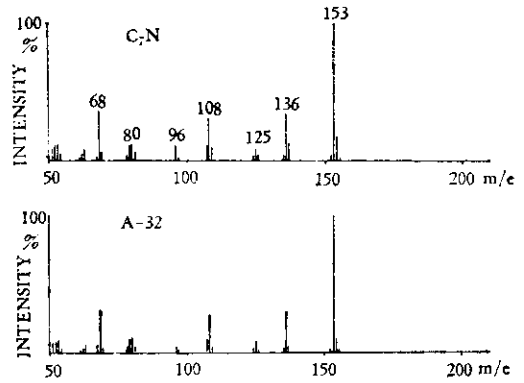


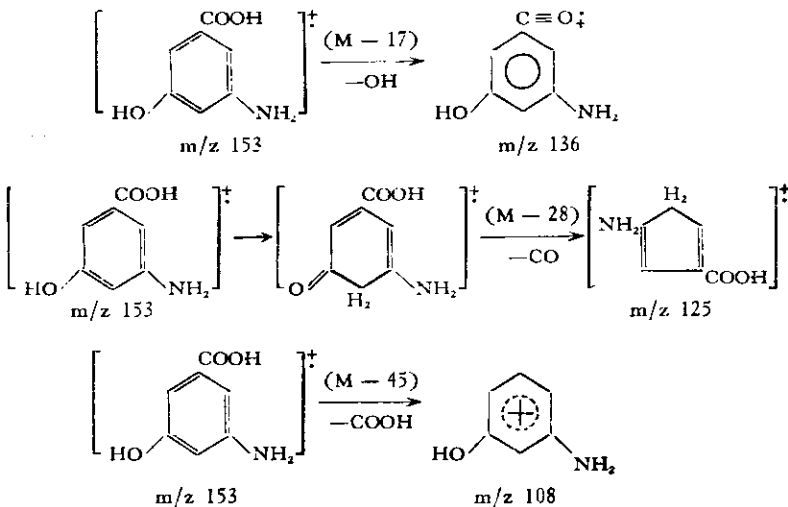
图 7 C_7N 和 A-32 质谱 (E. I) 图

Fig. 7 Mass spectrum (EI) of C_7N and A-32 (C_7N 低分辨率质谱蒸发温度 110°C, A-32 低分辨率质谱蒸发温度 100°C)

(C_7N low resolution mass spectrum evaporation temperature: 110°C A-32 low resolution mass spectrum evaporation temperature: 100°C)

为 1:2, 蒸发温度升至 100°C 时, 二者比例 1:4, 由此可见 C_7N 样品中较高的 m/z 96 是来自样品杂质的干扰。由上述结果看来, 化学合成的 C_7N 和 A-32 两个不同来源的化合物有同样的化学结构, 也就证明 A-32 结构是 3-羟基-5-氨基苯甲酸。

以上结果为 C_7N (3-羟基-5-氨基苯甲酸) 是力复霉素天然前体提供了更确切的论据, 因为 A-32 是天然产物。



再者,我们也进行了力复霉素分子中氮原子的参入途径的研究,结果证明谷氨酰胺促进力复霉素生物合成,谷氨酰胺的酰胺氮能高效率地参入力复霉素,以及谷氨酰胺能促进 rif 1 中间体 A-32 合成,显然 A-32(C₇N) 中氮原子来源于谷氨酰胺中的酰胺氮^[1]。A-32 中的七个碳原子从莽草酸途径中那一个中间体而来,则是一个颇有趣的问题,这方面工作还有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 焦瑞身等: 植物生理学报, 5: 185—191, 1974。
 [2] Chiao, J. S. and Y. M. Chen: *Advances in Biotechnology*, Murray Moo-young, Pergamon press, 1980, pp. 207—212。
 [3] Kibby, J. J. et al.: *J. Chem. Soc., Chem.*

Comm., 768—769, 1980.

- [4] White, R. J. et al.: *Nature*, 243: 273—277, 1973。
 [5] Ghisalba, O. and J. Nuesch: *J. Antibiotics*, 31: 215—225, 1978。
 [6] Martinelli, E. et al.: *Tetrahedron*, 30: 3089—3091, 1974。
 [7] Ghisalba, O. et al.: *J. Antibiotics*, 31: 1124—1131, 1978。
 [8] Ghisalba, O. et al.: *J. Antibiotics*, 34: 58—63, 1981。
 [9] 金志坤等: 微生物学报, 22(2): 165—168, 1982。
 [10] Omura, S.: *Bacteriological Review*, 40: 681—697, 1976。
 [11] 焦瑞身等: 中国科学(B辑), 1983年12期, pp. 1097—1104。
 [12] Milavetz, B. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 95: 5793—5795, 1973。

STUDIES OF THE BIOLOGICAL PROPERTIES AND STRUCTURE OF AN INTERMEDIATE, A-32, OF RIFAMYCIN BIOSYNTHESIS

Jin Zhikun Liu Cijun Chen Ping Li Shuwe Lu xiayan
 Wei Zhongdi Jui Shenchiao

(Department of Microbiology, Shanghai Institute of Plant Physiology, Academic Sinica)

Wang conghui

(Yanjing Science and Technology Service Company, Beijing)

In a previous paper, we have reported the isolation of two inactive mutants (rif 1, rif 2) that produced rifamycin through cosynthesis. In this paper, the isolation, biological characterization, physico-chemical properties and structural analysis of an intermediate, A-32, secreted by donor strain rif 1 are described. On the basis of physicochemical data, IR, NMR and MS measurement and biological characterization, as well as comparison of A-32 with synthetic compound, C₇N (3-

hydroxyl-5-aminobenzoic acid), the identity of A-32 with C₇N is confirmed.

As A-32 is a metabolic product of mutant rif 1, the results reported in this paper demonstrate that the C₇N, 3-hydroxyl-5-aminobenzoic acid moiety of rifamycin, suggested from structural consideration is a natural intermediate of rifamycin biosynthesis.

Key words

Rifamycin; Intermediate; Property; Structure.