

力复霉素生物合成中 ^{15}N 标记化合物参入的研究*

金志坤 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

使用稳定同位素 ^{15}N 标记化合物示踪方法, 研究力复霉素分子中氮原子代谢途径。结果证明: 硝酸钾 (K^{15}NO_3) 加入到 *rif1* 突变株, 在有机培养基发酵中能促进力复霉素的中间体 A32 的生物合成, 而且 ^{15}N 标记也参入到 A32 分子中。应用以 ^{15}N 标记谷氨酰胺为前体, 证明酰胺氮原子是 *rif1* 突变株产物 A32 分子中氮原子的供体。 ^{15}N 标记 A32, 不论在高产菌株, 还是无活力突变株经共合成, 都能参入到力复霉素分子中。通过上述实验, 阐明力复霉素氮原子的参入途径为 $\text{K}^{15}\text{NO}_3 \rightarrow \rightarrow \rightarrow ^{15}\text{NH}_3 \xrightarrow{\text{GS}} \text{谷氨酰胺}-\text{CO}^{15}\text{NH}_2 \rightarrow \rightarrow \rightarrow \text{A32}-^{15}\text{NH}_2 \rightarrow \rightarrow \rightarrow \text{力复霉素}-^{15}\text{NH}_2$ 。

关键词 力复霉素; ^{15}N 参入

力复霉素分子中碳架的生物来源 (除中间体 A32 即 C_7N 外) 已由 White 等^[1-3] 通过 ^{13}C -乙酸和 ^{13}C -丙酸同位素参入, 研究证明是来自 8 个丙酸和 3 个乙酸。而对于力复霉素分子结构中唯一的氮原子的生源和代谢途径已作了多方面研究^[4-7], 阐明力复霉素生物合成与谷氨酰胺合成酶比活力呈正相关性。通过稳定性同位素 ^{15}N 标记的硝酸钾和谷氨酰胺参入试验, 表明硝态氮和谷氨酰胺的酰胺基上的氮原子是力复霉素分子中氮原子的供体。对力复霉素中间体 A32 的结构分析和生物学特性研究^[8], 确定了中间体 A32 结构为 3-羟基-5-氨基苯甲酸^[9], 但当中间体 A32 加入到高产力复霉素的地中海诺卡氏菌株 NG12-4 发酵中, 并不能促进力复霉素产量的增加。Ghisaba 等^[9] 也观察到该中间体不能促进高产菌合成力复霉素。为了进一步了解力复霉素分子中氮原子的代谢途径, 探索中间体 A32 不能促进力复霉素产量的原因, 我们使用 ^{15}N 标记化合物参入的方法进行了研究。

材料和方法

(一) 菌种

地中海诺卡氏菌 (*Nocardia mediterranei*) NG12-4 是高产菌株。菌株 *rif1* 和 *rif2* 都是地中海诺卡氏菌 U 32 经诱变获得的无活力突变株。两者有共合成能力, *rif1* 分泌中间体 A32, *rif2* 则转化 A32 为力复霉素^[10]。

(二) 培养基

同前报道^[10]。

(三) 中间体 A32 定量测定

用琼脂块法测定, 同前^[11]。

(四) 稳定性同位素 ^{15}N 化合物测定

应用 NOI-5 型 ^{15}N -发射光谱测定仪测定。

(五) 菌体生长的测定

准确吸取 5ml 发酵液, 吸滤后用蒸馏水将菌体充分洗涤, 连同滤纸在 80℃ 烘干至恒重后称重。

(六) 试剂

本文于 1985 年 5 月 14 日收到。

* 陈平参加 ^{15}N 标记 A32 化学合成工作; 郭荷女参加部分技术工作。本实验 ^{15}N 标记化合物样品均由上海化工院新型材料研究室测定, 谨此致谢。

^{15}N -A32 为本实验室合成; K^{15}NO_3 、谷氨酰胺- $\text{CO}^{15}\text{NH}_2$ 由上海化工研究院新型材料研究室制备。

结果和讨论

(一) 硝酸钾促进 A32(C₁₅N) 产生及 ^{15}N 标记 KNO_3 参入 A32

硝酸钾对力复霉素 SV 合成的促进作用显著,在有机培养基中加入 0.8% KNO_3 , 力复霉素产量可增加 1.7 倍^[12]。rif 1 是从地中海诺卡氏菌 U32 经诱变获得的突变株,它分泌力复霉素生物合成途径的中间体 A32,有关它的生物学特性及结构测定已有报道^[3]。为了了解硝酸钾对突变株 rif 1 产生 A32 的影响,我们观察了不同浓度的硝酸钾对 rif 1 产生 A32 的变化(见图 1)。从中可见,加入 0.1% 硝酸钾后明显促进 A32 产生,其中 0.4% 硝酸钾促进 A32 产生最高,比对照增加 45%。

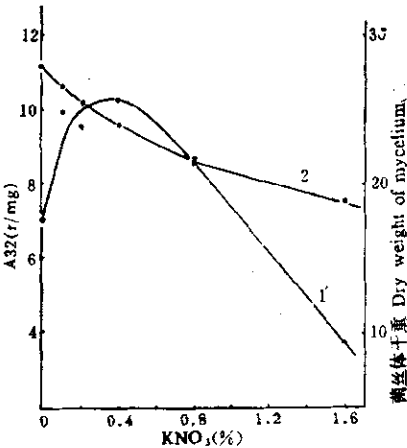


图 1 不同浓度的 KNO_3 对产生 A32 的影响
Fig. 1 Effect of different concentrations of KNO_3 on A32 production
1. A32; 2. 菌丝体干重 Dry weight of mycelium(mg/ml)

上述结果说明 KNO_3 对力复霉素突变株 rif 1 能促进其生物合成。在不同发酵时间加入 0.8% KNO_3 , 增产范围在 22—26% 之间。值得注意的是图 1 中 KNO_3 对

表 1 硝酸钾分子中 ^{15}N 参入 A32
Table 1. Incorporation of ^{15}N from K^{15}NO_3 to A32

^{15}N -标记物 ^{15}N -Labelled compd.	用量或得量(mg) Amount added or obtained	^{15}N 丰度(%) $^{15}\text{N}\%$ Excess	^{15}N 含量(mg) Amount of ^{15}N	参入率(%) Incorporation rate
K^{15}NO_3	3000	21.19	88.36	
A32	100	5.55	0.31	26.19
菌体(干) Mycelium(dried)	37800	2.58	62.51	
发酵液的上清液(干) Supernatant of broth (dried)		1.22		

rif 1 菌体的生长受到抑制。这在高产菌株中早已观察到^[12]。
为了研究 KNO_3 对 A32 产量促进的原因,使用 ^{15}N 的硝酸钾进行示踪实验。当 rif 1 在有机培养基中发酵 48 小时,加入

0.2% K^{15}NO_3 (^{15}N 原子的丰度为 21.19%), 然后继续培养至 120 小时取样,分离、纯化产物 A32, 并进行测定(见表 1)。在产物 A32 分子中 ^{15}N 丰度为 5.55% 时, ^{15}N 原子参入到 A32 分子中的参入率为 26.19%。

在研究力复霉素生物合成代谢调节中,硝酸盐不仅可作为力复霉素分子中氮原子的供体^[7],而且对产生菌的代谢途径起调节作用^[10,13,14]。硝酸钾使力复霉素产生菌中的 EMP、HMP、TMP 和莽草酸途径中有关酶的比活力显著提高。此外菌体中琥珀酰辅酶 A 转化为甲基丙二酰辅酶 A 的酶系活力也有提高,从而使菌体脂肪降低,有关前体转变成力复霉素。同样,在突变株 rif 1 中,也观察到一些相似现象。加入硝酸钾促进了 A32 产生,菌体生长则随 KNO_3 加入而下降。说明 KNO_3 对 rif 1 不仅可作为产物 A32 分子中氮原子的供体,也可能和力复霉素产生菌一样,在代谢途径中起调节作用。

(二) 谷氨酰胺- $\text{CO}^{15}\text{NH}_2$ 分子中 ^{15}N 参入 A32

谷氨酰胺在微生物代谢中是很活跃的初级代谢中间体,在微生物次级代谢中它也参与一些含氮抗生素的生物合成^[15,16]。在力复霉素生物合成中,谷氨酰胺分子中酰胺氮原子是力复霉素分子中氮原子的供体,谷氨酰胺也能促进突变株 rif 1 产生 A32^[4]。为了阐明谷氨酰胺促进 A32 产生的原因,以及谷氨酰胺的酰胺氮

和芳香中间体 A32 生物合成的关系,我们设计 ^{15}N 标记谷氨酰胺- $\text{CO}^{15}\text{NH}_2$ 参入 rif 1 的实验。在有机培养基中,当 rif 1 培养至 48 小时,加入 0.25% 谷氨酰胺- $\text{CO}^{15}\text{NH}_2$ (^{15}N 的丰度为 10.54%),继续培养到 96 小时,取样,分离纯化,用发射光谱的方法测定产物,结果见表 2。A32 的分子中 ^{15}N 丰度为 2.92%,谷氨酰胺- $\text{CO}^{15}\text{NH}_2$ 中 ^{15}N 参入率为 27.7%,表明谷氨酰胺的酰胺氮是中间体 A32 分子中氮原子的来源。

(三) 在 rif 2 转化下, ^{15}N -A32 中氮原子参入力复霉素

我们曾报道无活力突变株 rif 2 能转化 A32 为力复霉素^[4]。上述结果指出, A32 分子中氮原子由谷氨酰胺的酰胺氮所提供。为了进一步阐明芳香中间体 A32 分子中氮原子代谢,应用化学合成的 ^{15}N 标记 A32 作前体,经过 rif 2 突变株转化做示踪实验。当 rif 2 培养到 52 小时,在每升发酵液中加入 600 mg ^{15}N -A32 (氮原子丰度为 10.64%),继续培养,发酵至 120 小时,分离纯化力复霉素。用 ^{15}N 发射光谱方法测定,结果见表 3。测得产物中 ^{15}N 丰度为 8.65%。

^{15}N -A32 分子中氮原子参入到力复霉

表 2 ^{15}N -谷氨酰胺分子中酰胺 ^{15}N 参入 A32

Table 2 Incorporation of amide ^{15}N from ^{15}N -glutamine to A32

^{15}N 标记物 ^{15}N -labelled compd.	用量或得量 (mg) Amount added or obtained	^{15}N 丰度 (%) $^{15}\text{N}\%$ Excess	^{15}N 含量 (mg) Amount of ^{15}N	参入率 (%) Incorporation rate
谷氨酰胺- CO^{15}N Glutamine- CO^{15}N	3750	10.54	40.33	
A32	620	2.92	1.29	27.7
菌体(干) Mycelium (dried)	39000	1.68	36.34	
发酵液上清液(干) Supernatant of broth (dried)	20350	0.83	7.23	

表 3 ^{15}N -A32 促进突变株 rif² 合成力复霉素Table 3 Enhancement of rifamycin production by ^{15}N -A32

^{15}N -标记物 ^{15}N -labelled compd.	用量或得量 (mg) Amount added or obtained	^{15}N 丰度 (%) $^{15}\text{N}\%$ Excess	^{15}N 含量 (mg) Amount of ^{15}N	参入率 (%) Incorporation rate
^{15}N -A32	900	10.64	7.47	
力复霉素 Rifamycin	1000	8.65	1.82	81.3
菌体(干) Mycelium (dried)	51000	0.54	4.91	
发酵液的上清液(干) Supernatant of broth (dried)	19348	0.58	1.69	

素分子中的参入率为 81.30%。实验结果表明中间体 A32 与 rif² 共合成所产生的力复霉素分子中的酰胺氮来源于 A32 分子的氮原子,证明 A32 分子中的氮原子直接参入到力复霉素的生物合成。

(四) ^{15}N -A32 在力复霉素高产菌中参入

Ghisaba 等^[9]报道 C_7N (A32) 是力复霉素中间体,但将化学合成的 C_7N 加入到力复霉素产生菌发酵中并不能促进力复霉素的产量,我们证实 A32 是力复霉素的天然中间体,但在力复霉素高产菌 NG12-4 发

酵过程中加入 A32,同样不能促进力复霉素产量的增加。一个次级代谢途径的中间体不能促进次级代谢最终产物,其原因可假设为此中间体不能通过细胞膜进入菌体内,也可能是中间体在产生菌体内生物合成中已有足量的中间体合成,足够供应合成次级代谢最终产物的需要。在力复霉素生物合成中,A32 不能促进它的产量。为此,我们应用同位素 ^{15}N 标记 A32 进行参入试验。在有机培养基中接入力复霉素高产菌 NG12-4,在 28℃ 培养,48 小时后加入 600 mg/L 的 ^{15}N -A32 (^{15}N -A32 分子中氮原

表 4 ^{15}N -A32 分子中 ^{15}N 参入力复霉素Table 4 Incorporation of ^{15}N from ^{15}N -A32 to rifamycin

^{15}N -标记化合物 ^{15}N -Labelled compd.	用量或得量 (mg) Amount added or obtained	^{15}N 丰度 (%) $^{15}\text{N}\%$ Excess	^{15}N 含量 (mg) Amount of ^{15}N	参入率 (%) Incorporation rate
^{15}N -A32	660	10.64	5.48	
力复霉素 Rifamycin	1000	1.49	0.22	14
菌体(干) Mycelium (dried)	24200	0.43	1.15	
发酵液上清(干) Supernatant of broth (dried)	4550	0.52	1.71	

子的丰度为 10.64%), 继续培养 72 小时, 经过分离纯化, 分析测定 ^{15}N 同位素, 结果见表 4。力复霉素分子氮原子中所含 ^{15}N 原子为 1.49%, 氮原子的参入率为 14%, 表明中间体 ^{15}N -A32 能够参入到力复霉素分子中。至于 A32 不能促进产量提高的原因不是由于 A32 分子不能参入菌体, 而是菌体内已有足够的 A32 供力复霉素合成。由于菌体内中间体 A32 有所稀释, 使 ^{15}N -A32 的参入仅为 14%。

以上实验进一步阐明了力复霉素生物合成中氮原子的代谢途径为: $\text{K}^{15}\text{NO}_3 \rightarrow \rightarrow ^{15}\text{NH}_3 \xrightarrow{\text{GS}} \text{谷氨酰胺}-\text{CO}^{15}\text{NH}_2 \rightarrow \rightarrow \text{A32}-^{15}\text{NH}_2 \rightarrow \rightarrow \rightarrow \text{力复霉素}-^{15}\text{NH}_2$ 。

参 考 文 献

- [1] White, R. J. et al.: *Nature*, **243**: 5405, 273—277, 1973.
- [2] Martinelli, E. et al.: *Tetrahedron*, **28**: 3441—3448, 1973.
- [3] White, R. J. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* **71**: 3260—3264, 1974.
- [4] 焦瑞身等: 中国科学(B辑), **12**: 1079—1104, 1983.
- [5] 倪榴英等: 微生物学报, **24**(3): 217—223, 1984.
- [6] 倪榴英等: 抗生素, **9**(4): 301—306, 1984.
- [7] 金志坤等: 稳定同位素, 第一期: 25—28, 1983.
- [8] 金志坤等: 微生物学报, **24**(3): 210—216, 1984.
- [9] Ghisalbal, O. et al.: *J. Antibiotics*, **34**: 64—71, 1981.
- [10] 焦瑞身等: 植物生理学报, **5**: 185—191, 1974.
- [11] 金志坤等: 微生物学报, **22**(2): 165—168, 1982.
- [12] 焦瑞身等: 植物生理学报, **5**: 395—402, 1979.
- [13] 陈聿美等: 植物生理学报, **6**: 291—297, 1980.
- [14] 顾薇玲等: 微生物学报, **23**(4): 313—318, 1983.
- [15] Martin, J. F. et al.: *Genetics of Industrial Microorganisms* eds. O. K. Sebeck and A. I. Laskin, Washington, p. 83—89, 1978.
- [16] Sanchez, S. et al.: *Advances in Biotechnology*, eds. Murray Moo-young, Pergamon Press, **3**: 147—154, 1980.

FURTHER STUDIES ON THE ROUTE OF INCORPORATION OF NITROGEN ATOM INTO RIFAMYCIN

Jin Zhikun Chiao Juishen (J. S. Chiao)

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

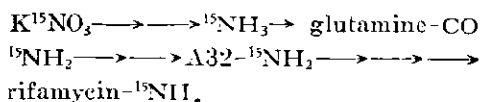
In this paper, the route of incorporation of nitrogen atom into rifamycin has been further investigated by studying the incorporation of ^{15}N -labelled compounds. Firstly, the yield of A32 by mutant rif 1 was enhanced by the addition of 0.1–0.8% potassium nitrate, but the growth of mycelium of rif 1 decreased appreciably. The nitrogen atom of the intermediate A32 originated from the nitrogen atom of potassium nitrate amounted to about 26.19%. Similarly, the amino nitrogen of intermediate A32 was derived from the nitrogen of ^{15}N -labelled glutamine to the extent of 27.7%.

Secondly, the inactive mutant rif 2 could convert ^{15}N -labelled A32 into amide nitrogen of rifamycin SV with a incorpora-

tion rate of 81.1%.

Finally, the effect of A32 on the production of rifamycin was tested in a high-producing strain of *N. mediterranei* NG12-4 and it was found that A32 did not stimulate the production of rifamycin SV, but ^{15}N -labelled A32 could be incorporated into rifamycin to 14%.

Based upon these observations, the route of incorporation of the nitrogen atom of rifamycin is formulated as follows:



Key words

Rifamycin; ^{15}N incorporation