

芳香途径终产物和中间体对力复霉素 SV 生物合成的调节作用

顾薇玲 夏天辉 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

本文报道了芳香化合物对力复霉素生物合成和芳香途径开始的 DAHP 合成酶活力的调节作用。首先, 洗涤菌体实验结果指出, 色氨酸对力复霉素 SV 合成有明显抑制, 苯丙氨酸和酪氨酸本身作用不明显。其次, 酶活力测定结果表明, 色氨酸抑制力复霉素生物合成是由于它对 DAHP 合成酶的反馈抑制; 同时, 在无细胞抽出液中酪氨酸和苯丙氨酸对色氨酸抑制也显示了协同作用。此外, 力复霉素芳香前体 (C_7N) 的结构类似物对氨基苯甲酸和对羟基苯甲酸对抗生素合成也有影响, 主要影响 C_7N 的生物合成。

关键词 芳香途径; DAHP 合成酶; 结构类似物

力复霉素是由一个芳香发色基团和一条脂肪链相连而成的。有关力复霉素的芳香部分 (C_7N) 的生源问题, 曾引起许多工作者的注意, 认为它是由莽草酸途径分叉而出, 但具体的分叉点尚不明确^[1-4]。我们采用阻断变种互补方法, 找出一对能通过互补而合成力复霉素 SV 的变种, 其中分泌株产生了一个芳香前体, 经过分离纯化和结构研究, 证明与文献报导的芳香前体 C_7N 相同。这就确证久已推论的芳香前体是天然产物^[5]。这些工作充分说明力复霉素 SV 生物合成与芳香氨基酸等的密切联系, 因此明确芳香氨基酸对力复霉素 SV 及其前体 C_7N 的调节关系是有其意义的。

本文报导芳香途径终产物和中间体对力复霉素合成的调节作用。

材料和方法

(一) 菌种

1. 地中海诺卡氏菌 (*Nocardia mediterranei*) NG 12-4。
2. 地中海诺卡氏菌 (*Nocardia mediterranei*) U-32。

3. 无活力变株: A-32 和 NG 131 是无活力的阻断突变株, 两者能进行生化互补, 从而合成力复霉素 SV。A-32 为 C_7N 产生菌, NG 131 为受体菌, 能转化 C_7N 为力复霉素 SV^[6]。

(二) 培养基和培养条件

1. 有机无渣培养基^[7]
2. 无机培养基^[8]

(三) 实验材料的制备

1. 洗涤菌体: (1) 在不加硝酸盐的有机无渣培养基中培养至 60 小时的菌体, 用灭过菌的漏斗过滤, 并用无菌水洗净, 悬于相当于有机发酵培养基浓度一半的半培养基中, 按需要加入添加物。(2) 用加硝酸盐的有机无渣培养基将菌体培养 60 小时, 过滤, 洗净后的菌体悬于相当无机培养基浓度 $\frac{1}{3}$ 的培养基中, 按需要加入添加物。

2. 无细胞抽出液: 菌体在无机培养基中培养 48 小时, 取出过滤, 再用蒸馏水抽滤洗涤, 加 50 mmol/L pH 7.1—7.2 磷酸钾缓冲液 (菌体: 缓冲液 = 2—3: 10, W/V)。MSE 超声波破碎 5—7.5 分钟, 16,000 r/min 离心 30 分钟 (4℃), 取上清液备用。

3. 无细胞抽出液的透析: 置无细胞抽出液于

本文于 1986 年 8 月 4 日收到。

透析袋中, 用 200—500 倍体积 pH 7.1—7.2 的 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液, 10℃ 以下透析 10—15 小时。

(四) 分析方法

1. 效价和菌体干重测定^[7,9]
2. DAHP 合成酶的测定: 按 Sprinson 法^[10]。
3. 芳香结构类似物对 C₁N 合成影响的测定: 见前文^[11]。洗涤菌体在 28℃, 180 r/min 旋转式接床保温 36 小时; 保温时加入添加物, 保温毕过滤, 清液加在 NG131 琼脂块上转化过夜, 于八叠球菌平板上测抑菌圈。

结果和讨论

(一) 芳香氨基酸的调节作用

在洗涤菌体中分别添加色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸等芳香氨基酸, 观察它们对于洗涤菌体合成力复霉素的影响 (表 1)。色氨酸对力复霉素 SV 的合成有明显抑制作用。苯丙氨酸略有促进作用, 而酪氨酸则略显抑制作用。

为了进一步验证上述芳香氨基酸对力

表 1 芳香氨基酸对力复霉素合成的影响*

Table 1 Effect of aromatic amino acids on rifamycin biosynthesis

实验序号 No. of experiment	添加物 Addition	力复霉素合成能力 Ability of rifamycin synthesis $\mu\text{g SV/mg}$ mycelia/h	力复霉素相对产量(%) Rifamycin yield, % of control
1	对 照 control	0.59	100
	苯丙氨酸 (2mg/ml) phe	0.65	110
	酪氨酸 (2mg/ml) tyr	0.44	75
	色氨酸 (2mg/ml) trp	0.22	37
	苯丙氨酸 (1.0mg/ml) phe 酪氨酸 (1.0mg/ml) tyr 色氨酸 (1.0mg/ml) trp	0.19	32
2	对 照 control	0.59	100
	苯丙氨酸 (1mg/ml) phe	0.68	115
	酪氨酸 (1mg/ml) tyr	0.47	79
	色氨酸 (1mg/ml) trp	0.21	36
	苯丙氨酸 (0.5mg/ml) phe 酪氨酸 (0.5mg/ml) tyr 色氨酸 (0.5mg/ml) trp	0.21	36

* 用不加硝酸盐培养的菌体为实验材料。

The mycelia grown without KNO₃.

复霉素 SV 生物合成的抑制作用,找出抑制部位,进行了无细胞抽出液的实验。在无细胞抽出液中,几种酶活力测定结果证明了整体细胞(洗涤菌体)中所获得结果,并且更进一步观察到色氨酸的作用部位是

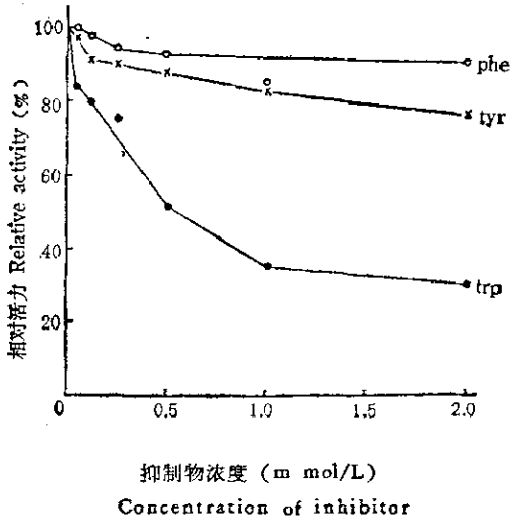


图1 三种芳香氨基酸对菌株 NG12-4 DAHP 合成酶的抑制作用

Fig. 1 The inhibition of three aromatic amino acids on DAHP synthase of strain NG12-4

表2 芳香氨基酸对 DAHP 合成酶的协同抑制作用
Table 2 Cooperative inhibition of aromatic amino acids on DAHP synthase

效应物 Effector (mmol/L)	菌株 Strain			
	U-32		NG12-4	
	OD _{549nm}	活力 (%) Activity	OD _{549nm}	活力 (%) Activity
对照 Control	0.66	100	0.65	100
酪氨酸 + tyr	0.47	71	0.48	74
苯丙氨酸 + phe	0.60	91	0.62	95
色氨酸 + trp	0.30	45	0.375	58
酪氨酸+苯丙氨酸 + tyr + phe + trp	0.11	17	0.16	25

芳香途径第一个酶,即 DAHP 合成酶(图1,表2)。

(二) C₇N 结构类似物对力复霉素生物合成及其酶系活力的影响

推测 3-氨基 5-羟基苯甲酸 (C₇N) 为力复霉素芳香发色基团的直接前体^[12]。我们实验室已证明了这一点^[7]。在洗涤菌体实验中添加 C₇N 的结构类似物对氨基苯甲酸、对羟基苯甲酸等,以观察它们在力复霉素生物合成中的作用(表3),可以看到三个化合物都明显地抑制力复霉素的合成。尤其是邻氨基苯甲酸和对氨基苯甲酸表现出极为强烈的抑制作用。在 0.05% 浓度下,几乎全部抑制了力复霉素的合成。

表3 对氨基苯甲酸、对羟基苯甲酸和邻氨基苯甲酸对力复霉素 SV 合成的影响*

Table 3 Effect of PABA, PHBA and ANA on rifamycin SV biosynthesis

添加物 Addition (0.5 mg/ml)	力复霉素 SV 产量 μg/mg 菌体 μg SV/mg mycelia	力复霉素相对产量 (%) Rifamycin yield, % of control
对照 Control	22.3	100
对氨基苯甲酸 PABA	2.24	10.0
对羟基苯甲酸 PHBA	11.24	51.3
邻氨基苯甲酸 ANA	0.40	1.8

* 用不加硝酸盐培养的菌体为实验材料。
The mycelia grown without KNO₃.

为进一步搞清芳香化合物对力复霉素合成影响的作用部位,用无细胞抽出液进行终产物、中间体对 DAHP 合成酶的影响研究。从表4可看到只有邻氨基苯甲酸对 DAHP 合成酶活力有抑制作用;而对氨基苯甲酸对该酶不存在反馈抑制。更进一步以 A-32 菌株洗涤菌体用 $\frac{1}{3}$ 浓度培养基为材料时加入对氨基苯甲酸、对羟基苯甲酸、邻氨基苯甲酸后保温,并用琼脂块转化

法(图2)定量测得三者对菌株 A-32 的 C_7N 合成都有明显抑制作用, 特别是对羟基苯甲酸作用更为强烈(表 5)。因为这些化合

表 4 芳香途径终产物及中间体对 DAHP 合成酶的影响

Table 4 Effect of terminal products and intermediates of aromatic pathway on DAHP synthase

效应物 Effector (1m mol/L)	菌株 Strain			
	U-32		NG12-4	
	OD _{549nm}	相对活力 (%) Relative activity	OD _{549nm}	相对活力 (%) Relative activity
对照 Control	0.75	100	0.67	100
对氨基苯甲酸 (PABA)	0.82	109	0.79	118
对羟基苯甲酸 (PHBA)	0.73	97	0.72	107
邻氨基苯甲酸 (ANA)	0.40	53	0.37	55

物是 C_7N 的结构类似物, 因而它们在从 C_7N 到力复霉素 SV 的转化中也可能表现出一定竞争性的抑制作用——“底物稀释”作用, 从而抑制了力复霉素的合成。

表 5 对氨基苯甲酸、对羟基苯甲酸、邻氨基苯甲酸对 C_7N 合成的影响

Table 5 Effect of PABA, PHBA and ANA on C_7N biosynthesis

添加物 Addition (1mg/ml)	转化为力复霉素 SV 的量 (μ g/ml) Transformation of C_7N into rifamycin SV	力复霉素相对产量 (%) Relative yield of rifamycin
对照 Control	14.5	100
对氨基苯甲酸 (PABA)	6.4	44.14
邻氨基苯甲酸 (ANA)	7.6	52.41
对羟基苯甲酸 (PHBA)	1.6	11.03

芳香氨基酸对洗涤菌体合成力复霉素的调节及无细胞抽出液的实验, 说明了色氨酸有终产物反馈抑制作用; 酪氨酸则略显抑制作用。在无细胞抽出液中, 酪氨酸和苯丙氨酸对色氨酸有协同抑制作用, 作用部位是在于抑制了 DAHP 合成酶的活力。虽然在整体细胞中出现苯丙氨酸对 SV 合成略有促进作用, 而在无细胞抽出液中, 高浓度的苯丙氨酸对 DAHP 合成酶又略显抑制作用, 但应指出的是, 在机体内游离氨基酸不可能达到 mg/ml 水平, 而图 1 在无细胞抽出液中苯丙氨酸在 0.05m mol/L 和 0.125 m mol/L (相当于 0.021mg/ml) 时, 对 DAHP 合成酶不呈显抑制。显然这一氨基酸对 DAHP 合成酶无抑制作用。在表 1 实验中, 氨基酸用量既高, 又是整体细胞, 情况复杂; 所以我们认为在低浓度下, 无细胞抽出液的结果可能更接近于生理状态。

在用 A-32 菌株的洗涤菌体保温测定

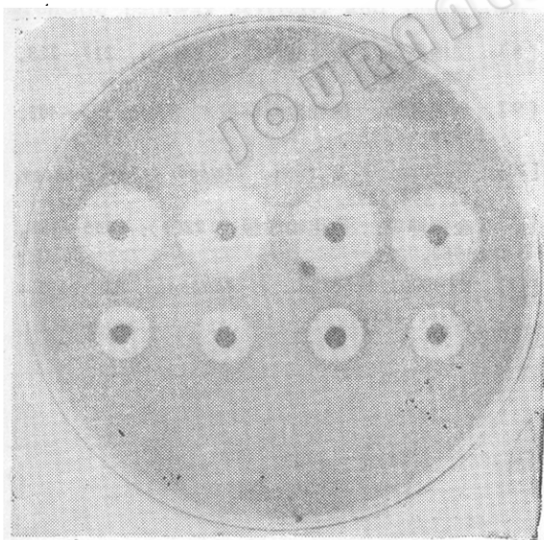


图 2 芳香结构类似物对 C_7N 合成的影响

Fig. 2 Effect of aromatic analogues on C_7N biosynthesis

上排: 对照

Above: control

下排: 结构类似物——PHBA

Below: analogue

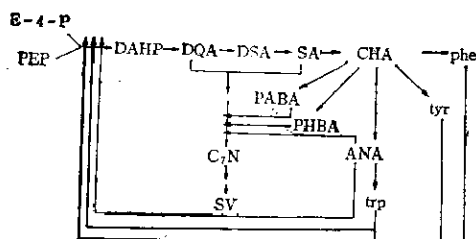


图3 芳香化合物对力复霉素合成反馈抑制作用

Fig. 3 The feedback inhibition of aromatic compounds on rifamycin biosynthesis

Abbreviations: E-4-P 4-磷酸赤藓糖
erythrose-4-phosphate

PEP 磷酸烯醇式丙酮酸
phosphoenolpyruvate

DAHP 3-脱氧-D-阿拉伯庚糖
糖酸-7-磷酸
3-deoxy-D-arabino he-
ptulosonic acid-7-phos-
phate

DQA 脱氢奎尼酸
dehydroquinone

DSA 脱氢莽草酸
dehydroshikimate

SA 莽草酸
shikimate

CHA 分支酸
chorismate

C₇N 的结构类似物对 C₇N 合成的抑制作用中,三个化合物所用浓度为 1 mg/ml. 为了验证三个结构类似物究竟是对 C₇N 合成的抑制,还是在 C₇N 转化为力复霉素 SV 时的底物与结构类似物“竞争”的“稀释”抑制。实验室的结果表明三个结构类似物对 C₇N 转化为力复霉素 SV 虽有影

响,但与前者相比,前者作用(表 5)是主要的,即对氨基苯甲酸、对羟基苯甲酸和邻氨基苯甲酸影响力复霉素的合成主要是抑制了 C₇N 的合成;且邻氨基苯甲酸对 DAHP 合成酶也存在一定反馈抑制作用,可能因为邻氨基苯甲酸是色氨酸的前体,与色氨酸的反馈抑制作用有关。

综上所述,可将芳香化合物对力复霉素 SV 的调节作用归纳为图 3。

参考文献

- [1] Karlsson, A. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **47**: 251—256, 1974.
- [2] White, R. J. and E. Martinelli: *FEBS Lett.*, **49**: 233—236, 1974.
- [3] Ghisalbal, O. and J. Nüesch: *J. Antibiotics*, **31**: 215—225, 1978.
- [4] Ghisalbal, O. and J. Nüesch: *J. Antibiotics*, **34**: 64—71, 1981.
- [5] 金志坤等: *微生物学报*, **24**(3): 210—216, 1984.
- [6] 焦瑞身等: *植物生理学报*, **5**(3): 185—191, 1979.
- [7] 焦瑞身等: *植物生理学报*, **6**(3): 291—298, 1980.
- [8] 倪榴英等: *微生物学报*, **24**(3): 217—223, 1984.
- [9] 焦瑞身等: *植物生理学报*, **5**(4): 395—402, 1979.
- [10] Sprinson, D. B. et al.: *Methods in Enzymology*, **5**: 394—398, 1962.
- [11] 金志坤等: *微生物学报*, **22**(2): 165—168, 1982.
- [12] Kazunori, H. et al.: *J. Antibiotics*, **35**: 1415—1416, 1982.

REGULATORY EFFECTS OF TERMINAL PRODUCTS AND INTERMEDIATES OF AROMATIC PATHWAY ON RIFAMYCIN BIOSYNTHESIS IN *NOCARDIA MEDITERRANEI*

Gu Weiling Xia Tianhui Jiao Ruishen (Chiao Juishen)

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

In this paper, the regulation of aromatic compounds on the biosynthesis of rifamycin and the first enzyme of aromatic pathway, DAHP synthase, is presented. In washed mycelia experiments, it was demonstrated that tryptophan inhibited the biosynthesis of rifamycin SV strongly; phenylalanine and tyrosine showed only weak effect. With cell-free extracts, the results from the washed mycelia experiments were confirmed. Tryptophan inhibited only the DAHP synthase of the aromatic pathway severely, and phenylalan-

ine and tyrosine gave cooperative effect to tryptophan. In addition, the analogues of aromatic precursor C₇N, such as *p*-aminobenzoic acid and *p*-hydroxybenzoic acid showed some inhibition on the biosynthesis of C₇N.

Key words

Aromatic pathway; DAHP synthase; Analogue