

创新霉素产生菌吡啶丙酮酸甲基转移酶的研究

曹 兢 戚天庆

(中国医学科学院抗菌素研究所,北京)

在创新霉素产生菌济南游动放线菌的无细胞提取物中检测到吡啶丙酮酸甲基转移酶活性,并进行了分离提取。该酶能利用 S-腺苷-L-甲硫氨酸对吡啶丙酮酸进行甲基化,它可能作用于创新霉素中间体的甲基化。经过硫酸铵分部盐析和 DEAE-纤维素柱层析,得到了纯化 60 倍的甲基转移酶,比活 0.66 mu/mg。酶的最适底物是吡啶丙酮酸,最适 pH 7.5,对于底物 S-腺苷-L-甲硫氨酸和吡啶丙酮酸的米氏常数 (K_m) 分别是 4×10^{-7} mol/L 和 1.8×10^{-7} mol/L。用 Sephadex G-150 凝胶过滤测得分子量是 55000 ± 5000 道尔顿。

关键词 创新霉素生物合成;吡啶丙酮酸甲基转移酶分离

创新霉素的衍生物脱硫创新霉素分子中的 β -甲基是其生物活性的必需结构^[1,2],在创新霉素生物合成中,中间体的甲基化是关键步骤,这一步骤可能与吡啶霉素生物合成中间体的甲基化^[3]相似。此酶将 S-腺苷-L-[甲基-¹⁴C] 甲硫氨酸的甲基转移至吡啶丙酮酸侧链的 3-位上,生成 3-甲基吡啶丙酮酸。本文研究了创新霉素产生菌济南游动放线菌 (*Actinoplanes jinanensis* n. sp.) 的吡啶丙酮酸甲基转移酶,以便进一步研究创新霉素的生物合成途径。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

济南游动放线菌 (*Actinoplanes jinanensis* n. sp.) 由本所菌种保藏组提供。

(二) 试剂

S-腺苷-L-[甲基-¹⁴C] 甲硫氨酸, 0.5 mCi/mmol (Amersham); DEAE-纤维素 DE52 (Whatman); Sephadex G-150 (Pharmacia); 其它试剂均采用二级品。

(三) 培养基

1. 菌种斜面培养基 (%): 麦片 6,琼脂 2,自来水配制,自然 pH。

2. 种子培养基 (%): 淀粉 3,黄豆饼粉 1,

鱼粉 0.5, K_2HPO_4 0.05, $Na_2S_2O_3$ 0.1, NH_4NO_3 0.2, $CoCl_2$ 0.0001, $CaCO_3$ 0.5, 自来水配制,自然 pH。

3. 发酵培养基 (%): 淀粉 4,玉米粉 3,鱼粉 0.5, 黄豆饼粉 1.5, $Na_2S_2O_3$ 0.5, K_2HPO_4 0.1, $CoCl_2$ 0.0001, $CaCO_3$ 1.0, 自来水配制,自然 pH。

(四) 济南游动放线菌的培养

用生长 7 天的济南游动放线菌接种种子培养基,在旋转摇床上培养 48h。再以 10% 接种量接种发酵培养基,在 28℃ 旋转摇床上培养 40h。离心收集菌丝细胞,生理盐水洗两次备用。

(五) 测定方法

1. 甲基转移酶活性测定: 参考 Speedie 等人的方法^[4]测定。在 pH 7.5,反应温度 30℃ 的实验条件下,每分钟转化一微克分子底物所需要的酶量定义为一个酶活力单位 (U)。

2. 蛋白测定: 按 Lowry 法进行^[5]。

3. 分子量: 采用凝胶过滤法测定^[6]。

实 验 结 果

(一) 创新霉素产生菌甲基转移酶活性

以 S-腺苷-L-[甲基-¹⁴C] 甲硫氨酸作

本文于 1987 年 2 月 20 日收到。

表 1 甲基转移酶活性检测

Table 1 Detection of methyltransferase activity

反应底物 (μmol) Substrate		甲基掺入 (cpm) Incorporation of methyl	
甲基供体 Donor	甲基受体 Receptor	对 照 Control	样 品 Sample
1.0	0.125	955	1703
1.0	0.25	1015	2375
1.0	0.50	987	3148

为甲基供体, 吡啶丙酮酸作为甲基受体, 观察创新霉素产生菌无细胞提取物中吡啶丙酮酸甲基转移酶活性, 结果见表 1。创新霉素产生菌可以使 S-腺苷-L-[甲基- ^{14}C]甲硫氨酸中的标记甲基掺入吡啶丙酮酸, 并且在一定范围内, ^{14}C 标记甲基的掺入随底物吡啶丙酮酸浓度提高而增加。说明创新霉素产生菌中有吡啶丙酮酸甲基转移酶存在。

(二) 吡啶丙酮酸甲基转移酶的分离提取

整个实验过程均在 4°C 进行。

1. 破碎细胞: 300g 湿菌丝细胞, 悬浮于 0.01mol/L pH7.0 磷酸缓冲液中, 用超声波破碎仪 (Soniprep 150, MSE) 破碎细胞。14000 \times g 离心 30min, 弃去沉淀。

2. 硫酸铵分部盐析: 在上清液中加入硫酸铵至 35% 饱和度, 用固体 Na_2HPO_4 调

至 pH7.0, 搅拌 40min。14000 \times g 离心 50min, 弃去沉淀。上清液中再加硫酸铵至 55% 饱和度, 用固体 Na_2HPO_4 调至 pH7.0, 搅拌 40min。14000 \times g 离心 50min, 弃去上清液。将沉淀溶于约 50ml 磷酸缓冲液中, 并对同样缓冲液透析过夜, 更换二次缓冲液。

3. DEAE-纤维素柱层析: 经过透析的样品以 0.5ml/min 的流速进入磷酸缓冲液平衡的 DEAE-纤维素柱 ($2.5 \times 55\text{cm}$)。用含 $0-0.4\text{mol/L}$ NaCl 的磷酸缓冲液 (各 250 ml) 进行梯度洗脱, 分部收集洗脱液。甲基转移酶的活性峰出现在 0.2mol/L NaCl 浓度的洗脱位置。以上各步纯化结果如表 2 所示。

(三) 甲基转移酶对色氨酸类似物的甲基化作用

以 S-腺苷-L-甲硫氨酸作为甲基供

表 2 甲基转移酶的分离纯化过程

Table 2 Summary of purification procedure for methyltransferase

分离步骤 Fraction	总活力 Activity (mU)	总蛋白 Total protein (mg)	比活力 Specific activity (mU/mg)	产率 Yield (%)	纯化倍数 Purification (fold)
粗提液 Crude extract	34.9	3216	0.011	100	
硫酸铵盐析 Ammonium sulfate fractionation	23.4	810	0.029	67.1	2.6
DEAE-纤维素柱层析 DEAE-cellulose column	6.1	9.2	0.66	17.5	60

表 3 甲基转移酶对色氨酸类似物的相对活力

Table 3 Relative activity of methyltransferase towards various analogue of tryptophan

底 物 Substrate	标记甲基掺入 (cpm) Incorporation of labeled methyl	相对活力(%) Relative activity
吲哚丙酮酸 Indole pyruvic acid	7006	100
吲哚乳酸 Indole lactic acid	1134	16
吲哚乙酸 Indole acetic acid	<350	<5
吲哚丙酸 Indole propionic acid	<350	<5
吲哚丙烯酸 Indole acrylic acid	<350	<5
吲哚丁酸 Indole butanoic acid	562	8
色氨酸 Tryptophan	1600	22

体, 应用分离到的甲基转移酶对某些色氨酸类似物进行甲基化作用测定, 观察甲基转移酶的底物专一性。反应系统含 S-腺苷-L-[甲基- ^{14}C] 甲硫氨酸 $1.0\mu\text{mol}$, 色氨酸类似物 $0.25\mu\text{mol}$, 0.4ml 酶制品, ^{14}C 标记甲基的掺入结果如表 3 所示。该酶对吲哚丙酮酸的甲基掺入最强, 因此最适底物是吲哚丙酮酸。

(四) 一般性质

1. 最适 pH: 以吲哚丙酮酸为底物, 测定不同 pH 条件下的酶活性 (图 1), 酶促反应最适 pH 为 7.5。

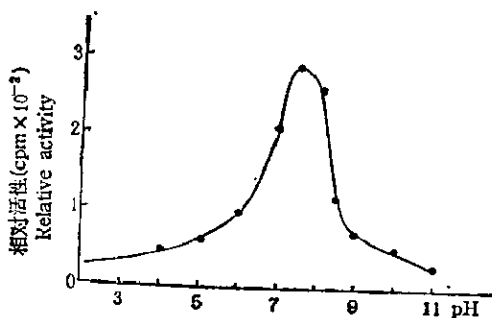


图 1 pH 对吲哚丙酮酸甲基转移酶活性的影响
Fig. 1 Effect of pH on the activity of methyltransferase

2. 米氏常数: 甲基供体和甲基受体两

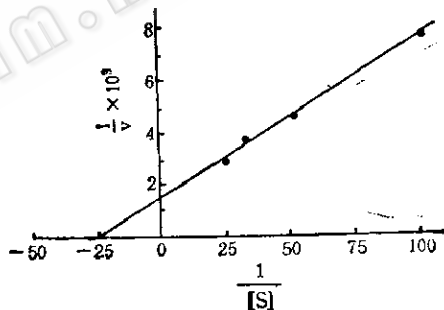


图 2 对 S-腺苷甲硫氨酸的米氏常数
Fig. 2 Michaelis constant for S-adenosylmethionine

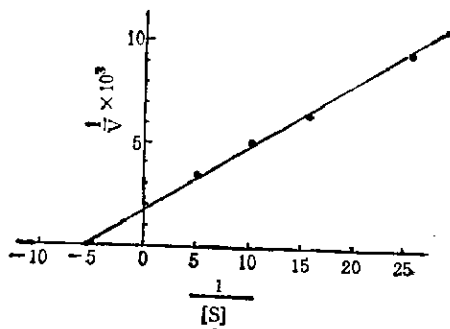


图 3 对吲哚丙酮酸的米氏常数
Fig. 3 Michaelis constant for indolepyruvic acid

一个底物,保持其中一个底物过量,测定另一底物浓度对酶活性的影响,按 Lineweaver-Burk 作图法,求得对 S-腺苷甲硫氨酸和吲哚丙酮酸的米氏常数分别为 4×10^{-5} mol/L (图 2) 和 1.8×10^{-7} mol/L (图 3)。

3. 分子量: 用 Sephadex G-150 凝胶过滤法测定创新霉素产生菌吲哚丙酮酸甲

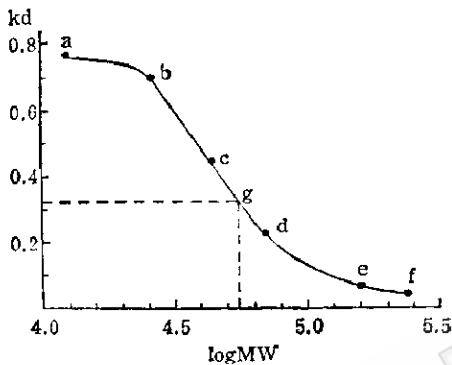


图 4 Sephadex G-150 测定分子量

Fig. 4 Determination of molecular weight by Sephadex G-150 gel filtration

- a. 细胞色素 C Cytochrome-C (12 400)
- b. 胰凝乳蛋白酶原 A Chymotrypsinogen A (25000)
- c. 卵清蛋白 Albumin aus Hühreerei (45000)
- d. 牛血清白蛋白 Albumin Bovine (67000)
- e. 醛缩酶 Aldolase (158000)
- f. 过氧化氢酶 Katalase (240000)
- g. 甲基转移酶 Methyltransferase

基转移酶的分子量。以各标准蛋白的 kd 值对分子量的对数作图,从曲线上查出吲哚丙酮酸甲基转移酶的分子量是 55000 ± 5000 道尔顿 (图 4)。

讨 论

应用标记甲基供体 S-腺苷-L-[甲基- ^{14}C] 甲硫氨酸测定创新霉素产生菌无细胞提取物对吲哚丙酮酸的甲基化作用,发现创新霉素产生菌中存在吲哚丙酮酸甲基转移酶,这为创新霉素生物合成途径的阐明提供了一定的依据。

创新霉素产生菌吲哚丙酮酸甲基转移酶的最适底物、最适 pH、分子量等与吲哚霉素产生菌吲哚丙酮酸 C-甲基转移酶基本一致^[4],只是米氏常数有些差异。

参 考 文 献

- [1] 戚天庆等: 中国医学科学院学报, 2:32, 1980.
- [2] 王立军等: 抗生素, 11(4): 338, 1986.
- [3] Hornemann, U. et al.: J. Amer. Chem. Soc., 93: 3023, 1971.
- [4] Speedie, M. K. et al.: J. Biol. Chem., 250: 7819, 1975.
- [5] Lowry, O. H. et al.: J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.
- [6] 林卓坤: 色谱法(一), 科学出版社, 北京, 第 61—86 页, 1982.

A STUDY ON INDOLEPYRUVIC ACID METHYLTRANSFERASE IN CHUANGXINMYCIN-PRODUCING STRAIN

Cao Jing Qi Tianqing

(*Institute of Antibiotics, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*)

The indolepyruvic acid methyltransferase, perhaps which is active in the biosynthetic pathway of the antibiotic chuangxinmycin, has been detected and partially purified from cell-free extracts of *Actinoplanes jinanensis* n. sp.. This enzyme catalyzes the transfer of a methyl group from S-adenosylmethionine to indolepyruvic acid. The methyltransferase has been purified 60-fold by ammonium sulfate fractionation and DEAE-cellulose column chromatography. The enzyme optimal sub-

strate is indolepyruvic acid. The enzyme has a pH optimum of 7.5. The double reciprocal plots gave K_m values of 4.0×10^{-5} mol/L for S-adenosylmethionine and 1.8×10^{-7} mol/L for indolepyruvic acid. A molecular weight of 55000 ± 5000 has been determined by Sephadex G-150 gel filtration.

Key words

Biosynthesis of chuangxinmycin; Indolepyruvate 3-methyltransferase/isolation