

力复霉素前体甲基丙二酰 CoA 合成途径的研究*

张蔚文 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

摘 要 力复霉素合成的碳前体之一(2R)-甲基丙二酰 CoA 至少可以有三条酶学合成途径。三条途径中的关键酶分别为甲基丙二酰 CoA 转羧基酶、丙二酰 CoA 羧化酶、甲基丙二酰 CoA 变位酶和甲基丙二酰 CoA 消旋酶。通过比较各个酶活性的时间进程和力复霉素合成时间的相关性,以及各个酶的底物亲和力,对它们在地中海拟无枝酸菌(*Amycolatopsis mediterranei*)甲基丙二酰 CoA 合成中的贡献作了排序,发现甲基丙二酰 CoA 变位酶途径是主要负责酶系。但是各个途径的贡献排序并不是固定不变的,能受到环境因素的调控,丙酸盐的加入将抑制甲基丙二酰 CoA 变位酶活力,而使得甲基丙二酰 CoA 转羧基酶成为主要酶系。甲基丙二酰 CoA 合成途径的多样性有助于细胞对环境变化的灵活反应。此外,对各个酶的调控特性也进行了研究。

关键词 甲基丙二酰 CoA, 合成途径, 调控

力复霉素是由一个芳香发色基团和一条多酮支链组成。力复霉素的脂肪链部分是由甲基丙二酰 CoA 和乙酰 CoA 前体逐步缩合而成的^[1],但有关甲基丙二酰 CoA 来源的研究却不多,利用¹³C 标记核磁共振发现在力复霉素和泰乐霉素合成中,琥珀酰 CoA 经由甲基丙二酰 CoA 变位酶(简称 MCM)催化是甲基丙二酰 CoA 的来源之一^[2, 3]。Hunaiti 等^[4]对红霉素产生菌 *Streptomyces erythreus* 的研究也发现甲基丙二酰 CoA 主要来自于琥珀酰 CoA。在 *Nocardia mediterranei*^[5]和 *S.erythreus*^[4]中还发现,丙酰 CoA 羧化酶催化的反应亦是甲基丙二酰 CoA 合成的途径之一。在 *S.fradiae* 中,也发现甲基丙二酰 CoA 转羧基酶(简称 MCT)活力和泰乐霉素合成的正相关性。目前认为至少有三条途径可导致甲基丙二酰 CoA 的形成,它们分别是甲基丙二酰 CoA 变位酶和甲基丙二酰 CoA 消旋酶(简称 MCR 途径、甲基丙二酰 CoA 转羧基酶途径和丙酰 CoA 羧化酶途径,我们的研究发现在力复霉素高产菌 *Amycolatopsis mediterranei* U32 中这三个途径的酶均处于相近的比活力水平,说明它们均有可能对甲基丙二酰 CoA 的合成作出贡献。但目前对这三条途径在力复霉素合成中的作用尚无系统讨论。我们对各个途径在力复霉素前体甲基丙二酰 CoA 合成中的作用进行了比较,并研究了各关键酶的调控性质,本文报道了这些研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌种

* 国家自然科学基金重点项目资助。

本文于 1994 年 12 月 8 日收到,1996 年 3 月 24 日定稿。

地中海拟无枝酸菌 U32 (*A. mediterranei* U32)

1.2 培养方法

按前文的方法^[6], 各种营养物质的加入量见文中。

1.3 实验材料制备

1.3.1 洗涤菌体: 在有机无渣培养基中培养 48h 的菌体, 用无菌布氏漏斗过滤收集, 用无菌蒸馏水洗涤后, 悬浮于相当于有机无渣培养基浓度一半的半培养基中, 需要加入的添加物详见文中。

1.3.2 无细胞粗提液: 培养好的菌体经过滤收集, 洗净后加入 3~5 倍体积的 50mmol/L, pH7.0, KH_2PO_4 -NaOH (内含 1mmol/L 的二硫赤藓糖醇) 缓冲液中, 冰浴中超声破碎仪处理, 4℃, 12000r/min (Backman Model J2-21M) 离心去沉淀, 收集上清液。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体生长测定: 干重称量法。

1.4.2 力复霉素 SV 效价测定: 杯碟法生物测定, 藤黄八叠球菌 (*Sarcina lutea*) 为检定标准菌。

1.4.3 蛋白质测定: 按 Bradford 的方法^[7], 以牛血清白蛋白为标准。

1.4.4 酶活力测定: 甲基丙二酰 CoA 变位酶、甲基丙二酰 CoA 消旋酶、甲基丙二酰 CoA 转羧基酶和丙酰 CoA 羧化酶的测定分别按 Kellermeyer 等^[8]、Allen 等^[9]、Wood 等^[10]和 Kaziro^[11]等方法进行, 均以每分钟转化 1 μ mol 底物定义为一个酶活单位, 比活力用每毫克酶蛋白中所含的酶活单位表示。底物琥珀酰 CoA 和丙酰 CoA 的合成按 Simon 的方法^[12]。MCM 全酶和脱辅基酶比例的测定按前文^[6]的方法。

1.4.5 蛇毒磷酸二酯酶 (SVPDE) 处理: 反应体系为 50mmol/L pH7.0 的 KH_2PO_4 -NaOH 缓冲液, SVPDE (Sigma 产品) 用量为 0.032u/mg 无细胞粗提液蛋白, 37℃ 保温, 不同时间间隔取样测定酶活力。

2 结果

2.1 MCM、MCR、MCT 和丙酰 CoA 羧化酶在力复霉素合成中的作用

力复霉素生物合成中起关键作用的酶的酶活水平的变化应该和力复霉素生成时间有一定的相关性, 为此, 我们检测了 MCM、MCR、MCT 和丙酰 CoA 羧化酶酶活的时间进程及其和力复霉素合成的关系, 结果见图 1。MCM 和 MCR 酶的活性增高和力复霉素合成速度上升有明显的正相关性。MCT 在相同的时间内仅有比较平稳的上升。丙酰 CoA 羧化酶活性仅出现在菌体生长的早期, 说明在力复霉素合成中可能主要是 MCM 和 MCT 酶系在起作用。值得注意的是, 在 *A. mediterranei* U32 中, 菌体生长期 (初级代谢时期) 和力复霉素合成期 (次级代谢时期) 在时间上基本平行, 两个阶段无明显区分, 这可能是由于该菌已经过多次诱变育种, 对次级代谢的阻遏已被解除, 这种现象在文献^[13]中有详尽讨论。

选择了四株不同力复霉素合成水平的变株, 分别测定了其胞内 MCM、MCR 和 MCT 的比活力以及力复霉素的合成量 (表 1)。结果说明 MCM 和 MCR 活力和力复霉素合成有正相关关系。在不同变株中 MCT 酶活变化不如 MCM 和 MCR 显著,

说明相对 MCM 而言,MCT 在力复霉素合成中可能仅起次要作用。

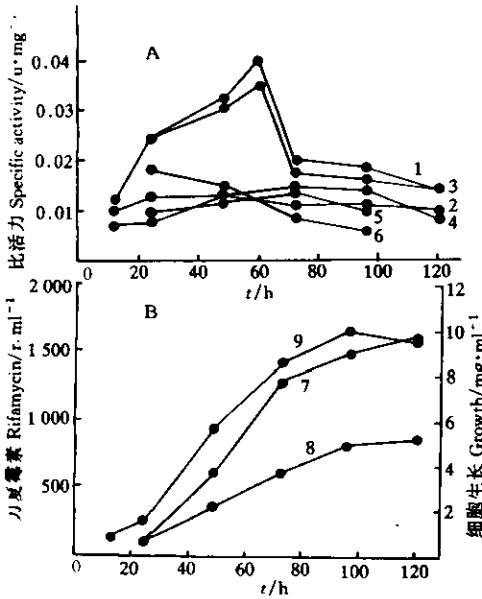


图1 在含或不含KNO₃的培养基中
A: MCM(1,2), MCR(3,4), MCT(5),
丙酰 CoA 羧化酶(6)比活力, B: 力复霉素
合成(7,8)和细胞生长(9)的时间进程

Fig.1 The time courses of MCM (1,2), MCR
(3,4), MCT(5), Propionyl-CoA carboxylase
(6), rifamycin synthesis (7,8) and cell growth
(9) in medium with or without nitrate.

丙酸盐对丙酰 CoA 羧化酶的诱导作用可被添加 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的氯霉素抑制,说明诱导作用涉及到酶蛋白的从头合成(图 2)。

表 1 不同力复霉素合成能力的变株中 MCM、MCR 和 MCT 比活力的比较

Table 1 Comparson of MCM, MCR and MCT activities of strains with different rifamycin-producing ability

菌株 Mutants <i>A.mediterranei</i>	MCM / $\text{u} \cdot \text{mg}^{-1}$	MCR / $\text{u} \cdot \text{mg}^{-1}$	MCT / $\text{u} \cdot \text{mg}^{-1}$	Rifamycin / $\text{r} \cdot \text{ml}^{-1}$
U32	0.0268	0.0268	0.014	1360
AS4.918	0.0061	0.0065	0.007	410
AS4.815	0.0021	0.0021	—	46
AS4.895	0.0029	0.0018	0.006	74

2.3 硝酸盐对 MCM 酶和 MCR 酶的调控

比较了加和不加硝酸盐培养条件下 MCM 和 MCR 比活力的变化,结果(图 1)验证了 KNO₃ 能较为显著地提高这两个酶的活力水平(2~3 倍)^[15]。由图可见未添加 KNO₃

根据酶的“生理效率”(V_m/K_m)的概念^[15, 14],我们比较了 MCM 酶对底物琥珀酰 CoA 和 MCT 酶对草酰乙酸和丙酰 CoA 的生理效率常数,发现 MCM 酶催化的转化反应比 MCT 酶快 9.43 倍(MCM 和 MCT 酶对底物的 K_m 、 V_m 值见另文^[6])。根据上述结果,可以排列出各个途径在甲基丙二酰 CoA 合成中的作用大小依次为 MCM 以及 MCR 酶途径、MCT 酶途径和丙酰 CoA 羧化酶途径。

2.2 丙酸盐对甲基丙二酰 CoA 合成途径的调控

添加丙酸盐对各个甲基丙二酰 CoA 合成途径有不同的调控作用。丙酸盐的加入明显抑制 MCM 酶活 80%,但能促进 MCT 和丙酰 CoA 羧化酶的活力(图 2),这使后两种酶成为负责甲基丙二酰 CoA 合成的关键酶。

比较 MCT 和丙酰 CoA 羧化酶对共同底物丙酰 CoA 的米氏常数 K_m 值,发现丙酰 CoA 羧化酶对丙酰 CoA 的 K_m 值为 0.1429mmol / L,这是 MCT 对丙酰 CoA 的 K_m 值 (0.027mmol / L) 5.29 倍,说明在 *A.mediterranei* U32 中,丙酰 CoA 主要是通过 MCT 催化而合成甲基丙二酰 CoA。

培养的菌体其 MCM 和 MCR 在整个菌体生长周期中均维持较低的水平,而加 KNO_3 培养的菌体这两个酶在 24~60h 中比活力可以迅速提高,这期间伴随着力复霉素的高速合成。硝酸盐的加入对菌体生长影响不明显。

不同时间向开始时未加 KNO_3 的培养物中补加 KNO_3 实验发现,添加时间愈早,对 MCM 和 MCR 的促进作用愈大,在 24h 添加可促进 MCM、MCR 酶活 50%~80%,48h 时也可促进 80%,在 72h 时再添加 KNO_3 对 MCM、MCR 比活力无影响。

在检测不同浓度的硝酸盐对 MCM、MCR 的促进作用时发现,较低浓度的 KNO_3 (0.1%) 仍有明显的促进作用,添加不同浓度 (0.1%~1.2%) 的 KNO_3 培养的菌体在初始阶段, MCM 和 MCR 活力有差别,24h 时添加 1.2% 的 MCM 和 MCR 活力分别是加 0.1% 的 1.78 和 2.24 倍,但在达到最大酶活峰时 (72h) 差别很小,只是 1.1 和 1.15 倍。促进作用并不和 KNO_3 浓度呈现正比例关系,说明 KNO_3 对 MCM 和 MCR 的促进可能并不是作为一种简单氮源在发挥作用,它对 MCM 和 MCR 的调控可能有更深入的作用机制。采用洗涤菌丝法进行的研究发现, KNO_3 对 MCM 和 MCR 酶活的促进依赖于新蛋白质的合成,翻译抑制剂氯霉素的加入能完全抑制 KNO_3 的促进作用。

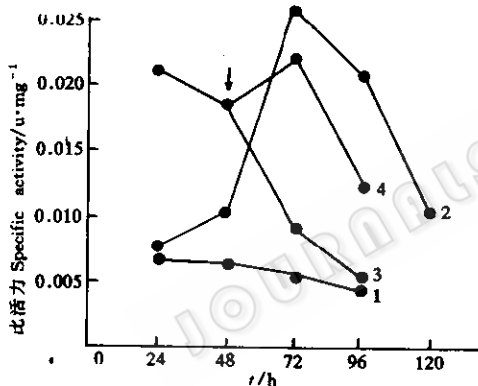


图2 在含丙酸盐的培养基中各个酶的活力的时间进程

MCM (1), MCT (2) 和丙酰 CoA 羧化酶 (4) 箭头表示加氯霉素, (3) 表示加氯霉素后的丙酰 CoA 羧化酶时间进程

Fig. 2 Time courses of enzymes in medium

containing propionate MCM (1), MCT (2) and propionyl-CoA carboxylase (4) The arrow indicates the time of adding chloramphenicol, (3) indicates the activity-time course of propionyl-CoA carboxylase after adding Chloramphenicol.

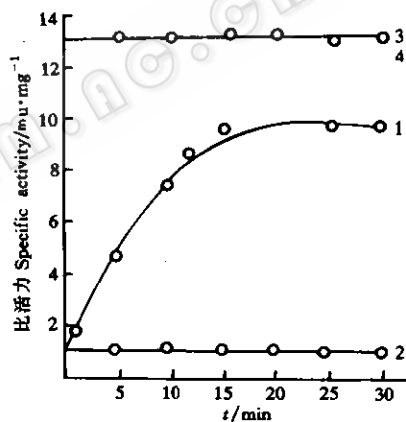


图3 粗提液中 SVPDE 对氨作用的 MCM 酶活力的影响

经氨作用的 MCM 酶中加 SVPDE (1); 不加 SVPDE (2)。未经氨作用的 MCM 酶中加 SVPDE (3), 不加 SVPDE (4)。

Fig. 3 Effect of SVPDE on ammonium regulation of MCM Crude extracts were incubated at 37°C with SVPDE, samples were taken at different time

1.Extracts from ammonium culture incubated with SVPDE; 2.Extracts from ammonium culture incubated without SVPDE; 3.Extracts from basal culture incubated with SVPDE; 4.Extracts from basal culture incubated without SVPDE.

2.4 氨盐对 MCM、MCR 和 MCT 酶的调控

氨盐及其代谢产物对抗生素生物合成的抑制已在多种微生物中发现^[16]。在培养基中添加氨盐也能明显影响 MCM、MCR 和 MCT 酶活性,添加 10mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 可以使 MCM、MCR 比活力下降 80% 左右,使 MCT 下降约 70%,而添加 40mmol/L 或更高浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的培养物中则完全检测不到 MCM 和 MCR 酶活。

此外,当向有机无渣培养基中处于对数末期的培养物中加入 20mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 时,在几分钟内即可观察到 MCM 酶活性的急激下降,达到原有酶活力的 1/10,而 MCR 酶活性几乎不受影响,这种现象十分类似于谷氨酰胺合成酶中的“氨休克”,由于我们已证明 $(\text{NH}_4)^+$ 或 SO_4^{2-} 对纯化 MCM 无明显的抑制作用^[6],故相信酶活力的急激下降可能不是简单的对酶活的抑制所造成,推测加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 后可能导致 MCM 发生了某种形式的修饰。用蛇毒磷酸二酯酶 (SVPDE) 处理经氨“休克”菌体的无细胞粗提液, MCM 酶活力又可以回升 (图 3),接近未被氨处理的对照菌体。从这些结果我们推测细胞内可能存在对 MCM 酶活性进行调控的机制,一种可能是 MCM 接受 ATP 的腺苷酰化共价修饰而变成无活性形式,经蛇毒磷酸二酯酶作用将 AMP 从腺苷酰化的 MCM 上水解下来,又恢复酶的活性。

2.5 丙酸盐对氨抑制力复霉素合成的影响

向含有 10mmol/L 或 40mmol/L 氨盐的发酵培养基中添加 10mmol/L 的丙酸盐能部分恢复力复霉素的合成 (表 2),这种作用平行于丙酰 CoA 羧化酶比活力的恢复。

表 2 丙酸盐对氨抑制甲基丙二酰 CoA 途径的调控

Table 2 The effects of ammonium with or without propionate on the enzymatic systems of methylmalonyl-CoA formation

	MCM / $\text{u} \cdot \text{mg}^{-1}$	MCT / $\text{u} \cdot \text{mg}^{-1}$	Propionyl-CoA carboxylase / $\text{u} \cdot \text{mg}^{-1}$	Rifamycin SV production / $\text{r} \cdot \text{ml}^{-1}$
对照 Control	0.0201	0.0161	0.0107	2580*
10mmol/L ammonium	0.0038	0.0038	0.0051	860
40mmol/L ammonium	0.0030	0.0030	0.0030	700
10mmol/L ammonium+	Nil	0.0038	0.0105	1650
10mmol/L propionate				
40mmol/L ammonium+	Nil	0.0059	0.0098	1400
10mmol/L propionate				

Nil: Indicate negligible

2.6 三羧酸循环中的化合物和氨基酸对 MCM、MCR 和 MCT 的调控

现有研究表明,琥珀酰 CoA 可能是联系初级代谢和次级代谢力复霉素合成的重要中介物质,因而其在胞内的浓度就显得十分重要,提高胞内琥珀酰 CoA 库的水平将会有助于促进甲基丙二酰 CoA 的合成。我们用洗涤菌丝法测定了三羧酸循环中六个碳化合物对 MCM、MCR 和 MCT 酶活的影响。结果发现,柠檬酸、 α -酮戊二酸对 MCM 酶活有促进,草酰乙酸、柠檬酸和 α -酮戊二酸对 MCR 酶活有促进。柠檬酸和 α -酮戊二酸处

于三羧酸循环中琥珀酰 CoA 之前,它们的存在显然有助于提高胞内琥珀酰 CoA 的浓度,但没有发现任何物质对 MCT 酶活力有促进作用。

氨基酸的碳骨架最终是通过三羧酸循环进行氧化分解,其中异亮氨酸、蛋氨酸和缬氨酸在通过琥珀酰 CoA 进入三羧酸循环过程中也会产生甲基丙二酰 CoA。Gygax 等^[5]曾发现异亮氨酸、蛋氨酸和缬氨酸能促进丙酰 CoA 羧化酶活力,这是由于这几个氨基酸的分解产物丙酰 CoA 能作为酶反应的底物促进酶活力。为考察它们对 MCM、MCR 和 MCT 酶活的影响,以洗涤菌丝法进行了研究。结果显示,缬氨酸、异亮氨酸和蛋氨酸能明显抑制 MCM 催化从琥珀酰 CoA 到 R-甲基丙二酰 CoA 的反应,动力学研究发现氨基酸的分解产物丙酰 CoA 可能是 MCM 的非竞争性抑制剂(图 4)。异亮氨酸能促进 MCT 酶活力,也可能是由于提供了 MCT 酶反应的底物。

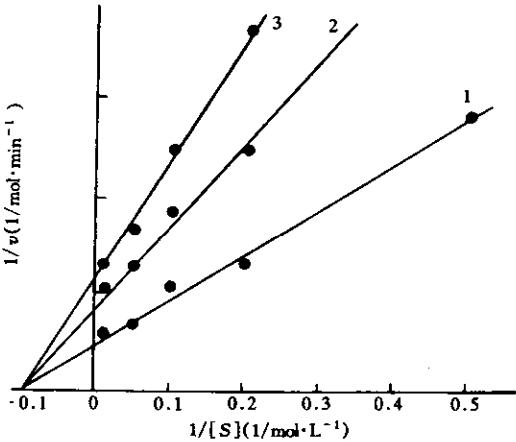


图 4 存在丙酰 CoA 时 MCM 对底物的动力学分析
Fig. 4 Lineweaver-Burk plot of the saturation kinetics of MCM with respect to succinyl-CoA with or without propionyl-CoA
1. Control; 2. with 0.1 mmol / L propionyl-CoA;
3. with 0.5 mmol / L propionyl-CoA.

2.7 CO²⁺和辅酶 B₁₂ 对 MCM 的调控作用

MCM 酶是一个钴胺素辅酶 B₁₂ 依赖性酶,相信钴离子或辅酶 B₁₂ 应该对该酶的活性变化产生影响,但实验显示钴离子和辅酶 B₁₂ 对 MCM 酶活并无影响。为此,我们又分别测定了钴离子和辅酶 B₁₂ 对 MCM 酶脱辅基酶、全酶比例的影响(表 3),说明 MCM 酶脱辅基酶蛋白的合成和 Co²⁺或辅酶 B₁₂ 无关,但 Co²⁺的存在对菌体合成辅酶所必需,缺乏辅酶 B₁₂ 将会限制酶蛋白活性的表达。Hertogh 等^[17]在研究 *Rhizobium* 的丙酸代谢时亦发现类似现象,培养基中缺乏 Co²⁺时,MCM 酶蛋白不显示酶活力。

表 3 金属钴离子和辅酶 B₁₂ 对 MCM 酶全酶合成的影响

Table 3 Effect of Co²⁺ and coenzyme B₁₂ on the proportion of holoenzyme

Coenzyme B ₁₂ (× 10 ⁻⁴ mmol / L)	全酶比例 Holoenzyme / (%)	Co ²⁺ (× 10 ⁻⁴ mmol / L)	全酶比例 Holoenzyme / (%)
0	18.7	0	18.7
3.17	57.1	4.13	41.2
6.34	62.5	8.26	50.0
12.68	71.4	16.52	62.5
31.70	100.0	41.32	83.3
		82.64	100.0
		165.28	100.0

3 讨论

通过对力复霉素合成中碳、氮代谢途径中几个关键酶比活力的比较研究发现,甲基丙二酰 CoA 的合成是力复霉素生物合成的一个限速步骤(数据未显示)。我们对几条途径在力复霉素合成中的作用的研究结果发现,在发酵培养基中,MCM 和 MCR 催化的琥珀酰 CoA 异构化可能是甲基丙二酰 CoA 合成的主要途径。在培养基中添加丙酸盐后,甲基丙二酰 CoA 转羧基酶则成为甲基丙二酰 CoA 合成的主要负责途径。甲基丙二酰 CoA 合成途径的多样性有助于细胞对环境变化的灵活反应(图 5)。

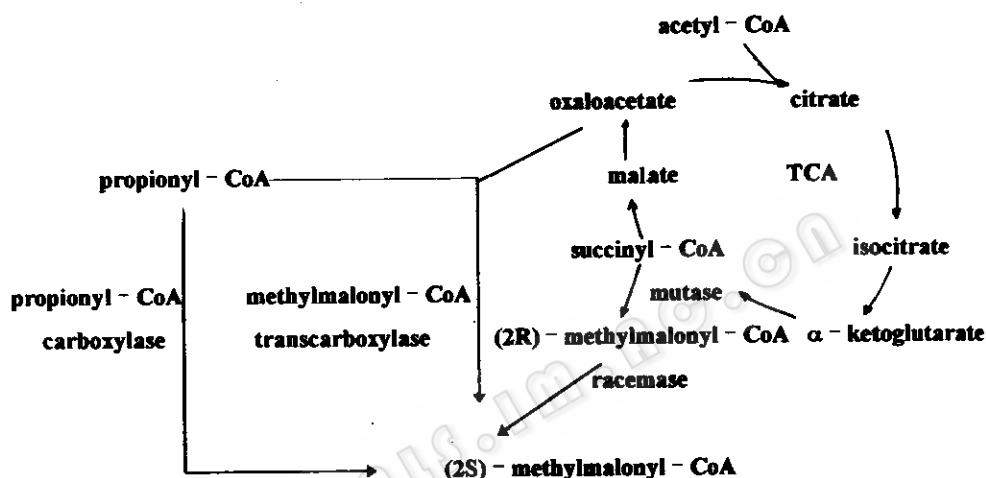


图 5 甲基丙二酰 CoA 合成的可能途径

Fig. 5 Possible metabolic pathways of methylmalonyl-CoA formation

结果验证了硝酸盐对 MCM 和 MCR 酶活力的促进作用^[15],且这种促进不是 KNO₃ 作为简单氮源所发挥的, KNO₃ 的作用有助于促进酶蛋白的合成,这为硝酸盐利用调节子(nut regulon)的假说又提供了一个佐证^[18]。

参 考 文 献

- [1] White R J, Martinell E, Gallo G G *et al.* *Nature (London)*, 1973, 243: 273.
- [2] Corcoran J M. Rifamycin. In: Corcoran J M ed. *Antibiotics*. Vol 4. Berlin: Springer-Verlag, 1981. 134~174.
- [3] Omura S H, Takeshima A, Nakayawa N *et al.* *Bioorg Chem*, 1976, 5: 450~455.
- [4] Hunaiti A A, Kolattukudy O E. *Antimicrobial Agent: Chemotherapy*, 1984, 25: 173~178.
- [5] Gyax D, Stalder R, Nuesch J. *FEMS Microbiol Lett*, 1984, 23: 211~216.
- [6] 张蔚文, 焦瑞身. *微生物学报*, 1996, 36(3): 199~207.
- [7] Bradford R W. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248~254.
- [8] Kellermeyer R W, Wood H G. *Meth Enzymol*, 1969, 13: 207~214.
- [9] Allen S H G, Kellermeyer R W, Wood H G. *Meth Enzymol*, 1969, 13: 194~198.
- [10] Wood H G, Jacobson B. *Meth Enzymol*, 1969, 13: 215~227.
- [11] Kaziro Y. *Meth Enzymol*, 1969, 13: 181~189.
- [12] Simon B J, Shemim D. *J Am Chem Soc*, 1953, 75: 2520.
- [13] Demain A L. Secondary Metabolite. In: Chadwick D J *et al.* eds. *Secondary Metabolites: Their function and evolution*. New York: John Wiley & Sons, 1992. 4~5.

- [14] Pollock M R. *Biochem J*, 1965, **94**: 666~675.
- [15] 顾薇玲, 焦瑞身. *微生物学报*, 1983, **23**: 313~318.
- [16] Aharonowitz Y. *Ann Rev Microbiol*, 1980, **34**: 210~229.
- [17] Hertogh A A D, Mayeux P A, Evans H J. *J Biol Chem*, 1964, **239**: 2446~2452.
- [18] Chiao J S, Xia T H, Ni L Y *et al*. Rifamycin and Related Ansamycin. In: Vining L C. ed. *Genetic and Biochemistry of Antibiotic Production*. Boston: Butterworth-Heinemann, 1995. 447~498.

THE REGULATION OF METHYLMALONYL-CoA FORMATION PATHWAYS IN RIFAMYCIN SV-PRODUCING *AMYCOLATOPSIS MEDITERRANEI* U32

Zhang Weiwen Jiao Ruishen

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032)

Abstract (2R) -Methylmalonyl-CoA, carbon precursor for rifamycin SV could be synthesized through at least three enzymatic systems from intermediates of TCA cycle and other pathways, they are methylmalonyl-CoA transcarboxylase, propionyl-CoA carboxylase, MCM and MCR. By comparing the time course of enzymatic activity with that of rifamycin synthesis and the K_m values of the enzymes showed that MCM was the main enzyme responsible for the methylmalonyl-CoA formation in *A. mediterranei* U32. The contribution of various systems was subject to regulation of environmental factors. The addition of propionate into medium makes the methylmalonyl-CoA transcarboxylase become the main enzyme responsible for the methylmalonyl-CoA formation. In addition, the regulatory characteristics of the key enzymes in various pathways were studied.

Key words Methylmalonyl-CoA formation, Synthesised pathway, Regulation