

头状轮生链霉菌芳香族氨基酸合成途径的调节

崔风文 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

摘 要 对头状轮生链霉菌(*Streptovorticillium caespitosus*)芳香氨基酸合成途径的研究表明,第一个酶即 3-脱氧- α -阿拉伯庚酮糖-7-磷酸(DAHP)合成酶无同工酶,不被 L-色氨酸阻遏,比活力可被硝酸盐促进。L-色氨酸强烈地反馈抑制此酶,L-酪氨酸和 L-苯丙氨酸无作用。L-色氨酸的反馈抑制对磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)是非竞争性的, K_i 为 $373 \mu\text{mol/L}$ 。酶对 PEP 和 4-磷酸赤藓糖(E4P)的 K_m 值分别为 50 和 $100 \mu\text{mol/L}$ 。PEP 和 Co^{2+} 对酶有稳定作用。邻氨基苯甲酸合成酶活力可被 1mmol/L L-色氨酸完全抑制,此酶也受 L-色氨酸的阻遏,但是色氨酸支路上其余 4 个酶不被阻遏。分支酸变位酶被 L-酪氨酸抑制。L-苯丙氨酸抑制预苯酸脱水酶,并更强地抑制预苯酸脱氢酶。

关键词 头状轮生链霉菌,芳香族氨基酸,DAHP 合成酶

芳香族氨基酸合成途径在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等菌中已有详尽报道^[1],但对放线菌的研究较少。我们实验室曾阐明了地中海拟无枝酸菌此途径的调节^[2,3]。包括丝裂霉素在内的一些环桥类抗生素的分子结构均以 3-氨基-5-羟基苯甲酸(C_7N)单元^[4]为前体,最近 Gyax 等^[5]应用突变菌株证明形成 C_7N 支路的分支点是 DAHP,显然芳香氨基酸途径与丝裂霉素等的生物合成密切相关。本实验室的初步研究表明芳香族氨基酸能降低头状轮生链霉菌丝裂霉素的产量。本文报道此菌芳香族氨基酸合成途径的调控方式。

1 材料和方法

1.1 试剂

PEP 及 Sephadex G-25 为 Sigma 产品,DE-52 纤维素为 Whatman 产品,其余除自制药品外均为试剂级。

1.2 菌种和培养条件

1.2.1 菌种:见表 1。

1.2.2 培养基 1 (%): 葡萄糖 3, 蛋白胨 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.1, NaCl 0.2, 麦芽糖 1, 黄豆粉(沸水抽提液) 1.5, pH7.5。培养方法:每 50ml 培养基接种一环孢子和菌丝体或 0.1ml 孢子悬液,在转动半径 2.5cm, 转速 180r/min 的转床上培养 48h。

1.2.3 培养基 2 (%): 葡萄糖 4, 可溶性淀粉 1, 黄豆粉(沸水抽提液) 1, 酵母粉 1, 玉米浆

1, 蛋白胨 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, CaCO_3 0.6, 自然 pH。培养方法: 按 10% 的接种量接种种子液, 在同上的转床上培养, 4°C , $10000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min 收集菌体, 以蒸馏水洗涤, -20°C 保存。

表 1 菌种特性及来源

Table 1 Strains of bacteria

菌 种 Strain	培养基 Medium	培养温度 $t/^\circ\text{C}$	特 征 Characteristics	来 源 Source
头状轮生链霉菌 <i>Str. caespitosus</i> ATCC27422	1,2,3	28	丝裂霉素产生菌 Mitomycin producer	ATCC
大肠杆菌 BT36 <i>Escherichia coli</i> BT36	4	37	色氨酸、酪氨酸和苯丙 氨酸缺陷型 Trp-Phe-Tyr-	李世杰赠
恶臭假单胞菌 S21 <i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> S21	5	37	缺失磷酸核糖邻氨基苯 甲酸异构酶基因 ΔtrpC	Crawford, I.P.
大肠杆菌 $\text{trpA}_2/\text{F}'\text{trpA}_2$ <i>E. coli</i> $\text{trpA}_2/\text{F}'\text{trpA}_2$	5	37	缺失色氨酸合成酶 A 基因 ΔtrpA	Crawford, I.P.

1.2.4 培养基 3(g/L): 葡萄糖 40, K_2HPO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, NaCl 1, CaCO_3 0.3, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4, 微量元素液 1ml($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%), pH7.5。培养方法同培养基 2, 但以抽滤法收集菌体, 蒸馏水洗涤。

1.2.5 培养基 4 及培养方法: 见文献[6]。

1.2.6 培养基 5 及培养方法: 见文献[7]。

1.3 方法

1.3.1 无细胞抽提液的制备: 取湿菌体, 加 2~5 倍 pH7 的 50mmol/L 磷酸钾缓冲液 (对恶臭假单胞菌 S-21 加 pH7.5, 50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液)。冰浴中超声破碎, 于 4°C 以 $12\,000\text{r}/\text{min}$ 离心 20min, 取上清备用。

1.3.2 芳香族氨基酸合成途径中部分中间体的制备: E4P: 按 Simpson 等^[8]的方法; 分支酸: 按 Keller 等^[9]和戚天庆等^[6]的方法, 由大肠杆菌 BT36 的保温液中得到; 预苯酸: 按 Gibson 等^[10]的方法; CdRP[1-(O-Carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose-5-p]: 按 Thomas 等^[11]的方法; 吡啶甘油磷酸: 按 Wegman 等^[12]的方法, 由大肠杆菌 $\text{trpA}_2/\text{F}'\text{trpA}_2$ 无细胞抽出液催化 CdRP 转化为吡啶甘油磷酸; 邻氨基苯甲酸磷酸核糖: 按 Sugimoto 等^[13]的方法, 在恶臭假单胞菌 S-21 无细胞抽出液的催化下, 由邻氨基苯甲酸和磷酸核糖焦磷酸合成。

1.3.3 酶活力测定: DAHP 合成酶(EC4.1.2.15): 按 Jensen 等^[14]和 Takahashi 等^[15]的方法, 于 pH6.4 测 OD_{549} , 一个酶活单位为每分钟产生 1nmol DAHP 所需的酶量; 邻氨基苯甲酸

合成酶: 按 Gelfand 等^[16]的方法, 于 pH7.5 测定; 分支酸变位酶: 按 Ahmad 等^[17]和 Cotton 等^[18]的方法, 于 pH7.5 测定; 预苯酸脱水酶: 按 Ahmad 等^[17]和 Cotton 等^[18]的方法, 于 pH8.0 测定; 预苯酸脱氢酶: 按 Boer 等^[19]和 Collier 等^[20]的方法, 于 pH7.5 测定; 邻氨基苯甲酸转磷酸核糖酶 (于 pH7.0 测定)、邻氨基苯甲酸磷酸核糖异构酶、吲哚甘油磷酸合成酶、色氨酸合成酶 A、色氨酸合成酶 B 等按 Thomas 等^[11]和 Sugimoto 等^[13]的方法。

1.3.4 蛋白质测定: Bradford^[21]法。

1.3.5 菌体生长: 按文献^[22]测定。

1.3.6 DE-52 柱层析: 将头状轮生链霉菌的无细胞抽提液过 Sephadex G-25 柱 (2×20cm, 预先以 10mmol/L pH7 的磷酸钾缓冲液平衡), 收集蛋白部分, 将含 100mg 蛋白的溶液上 DE-52 柱 (2×20cm, 预先以 10mmol/L pH7 的磷酸钾缓冲液平衡), 先以 70ml 10mmol/L pH7 的磷酸钾缓冲液洗脱, 再以 300ml 含 0~0.6mol/L KCl 的 10mmol/L pH7 磷酸钾缓冲液洗脱, 每 2.2ml 收集一管, 合并酶活高的部分, 即为部分纯化的 DAHP 合成酶。

2 结果和讨论

2.1 DAHP 合成酶的调节

2.1.1 培养条件: DAHP 合成酶是整个芳香族氨基酸合成途径的第一个酶, 它的活力控制着这条途径的流量。以培养基 3 培养头状轮生链霉菌, 随着时间的延长, DAHP 合成酶的比活逐渐下降, 因此选定的条件为培养 24h。

2.1.2 DAHP 合成酶的性质和调节: 许多微生物的 DAHP 合成酶有同工酶, 如大肠杆菌的有 3 个^[1], *Schizosaccharomyces pombes* 有 2 个^[23]等。我们对头状轮生链霉菌的 DAHP 合成酶进行了考查。由图 1 可见, 从 DE-52 纤维素柱上只洗下一个狭窄的 DAHP 合成酶活力峰, 所以只有单一的 DAHP 合成酶。

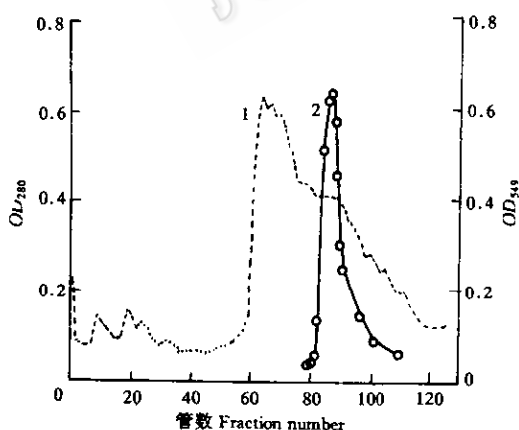


图 1 DAHP 合成酶过 DE-52 柱的洗脱图

Fig.1 Elution profile of DAHP synthase from DE-52 column

1. 蛋白 Protein (OD₂₈₀); 2. 酶活力 Activity (OD₅₄₉).

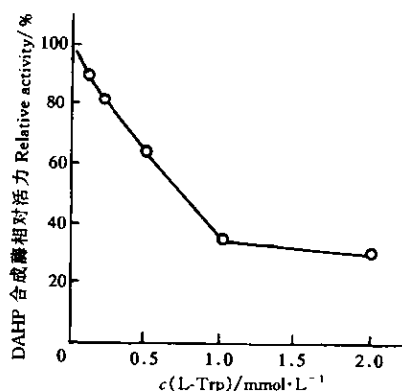


图 2 L-色氨酸对 DAHP 合成酶的反馈抑制

Fig.2 Feedback inhibition of L-Trp on DAHP synthase

此菌的 DAHP 合成酶不稳定。试验了一些金属离子对此酶的影响,发现 Co^{2+} 有激活作用, $125\mu\text{mol/L}$ 的 Co^{2+} 使 OD_{549} 由 1.74 提高到 1.90,其余的 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 等金属离子不同程度地抑制 DAHP 合成酶。将 DAHP 合成酶对含 $100\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 的磷酸缓冲液透析过夜,酶活能保持 89.6%,但是 Co^{2+} 不能使透析失活的 DAHP 合成酶复活。此外底物 PEP 对酶有稳定作用。

在 DE-52 柱部分纯化的酶液中, L-色氨酸 (L-Trp) 能抑制 70% 的酶活, L-酪氨酸 (L-Tyr) 和 L-苯丙氨酸 (L-Phe) 无抑制,见图 2 和表 2。Boer 等^[19]指出,放线菌中 DAHP 合成酶受 L-Phe 和 L-Tyr 抑制的程度不大,主要受 L-Trp 的抑制。头状轮生链霉菌的情况与此符合。

由图 3 可见,对 E4P 来讲, L-Trp 对 DAHP 合成酶的抑制为非竞争性抑制, K_i 为 $373\mu\text{mol/L}$ 。

培养基中加入 L-Trp 或三种芳香族氨基酸的等摩尔混合物 (Aro), DAHP 合成酶的比活基本上没有变化,如图 4 所示。

有机培养基分别加入 KNO_3 (0.6%) 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.4%), DAHP 合成酶的比活力受前者促进,培养两 d 提高了 2.88 倍。

2.2 其他几个关键酶的调节

以过 Sephadex G-25 柱部分纯化的酶液进行研究,结果列于表 2 和表 3。

表 2 芳香族氨基酸合成途径上几个酶的调节*

Table 2 Regulation of several enzymes of aromatic amino acids biosynthesis pathway

酶 Enzyme	相对酶活力 Relative activity / %				
	None	L-Trp	L-Phe	L-Tyr	Aro
DAHP 合成酶 DAHP synthase	100	41	101	109	52
邻氨基苯甲酸合成酶 Anthranilate synthase	100	0	100	100	0
分支酸变位酶 Chorismate mutase	100	70	98	84	83
预苯酸脱水酶 Prephenate dehydratase	100	100	35	81	24
预苯酸脱氢酶 Prephenate dehydrogenase					
(NAD^+)	100	35	10	74	22
(NADP^+)	100	69	6	94	24

* 表中抑制剂的浓度均为 1mmol/L 。The concentration of each inhibitor was 1mmol/L 。

表 3 芳香族氨基酸合成途径上几个酶的 K_m 、 K_i 值

Table 3 K_m , K_i values of several enzymes of aromatic amino acids biosynthesis pathway

酶 Enzyme	$K_m / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$K_i / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		
		L-Trp	L-Phe	L-Tyr
DAHP 合成酶	50(PEP)		—	—
DAHP synthase	100(E4P)	373	—	—
邻氨基苯甲酸合成酶	400		—	—
Anthranilate synthase				
分枝酸变位酶	5000	2500	—	5000
Chorismate mutase				
预苯酸脱水酶	448	—	476	3125
Prephenate dehydratase				

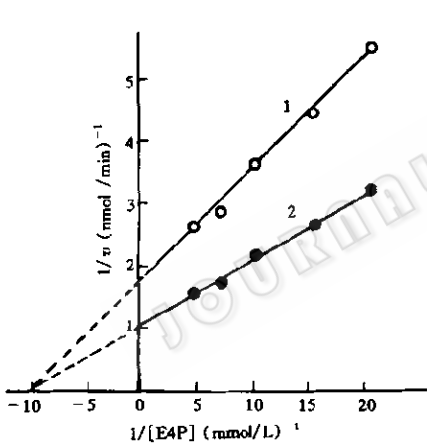


图 3 L-Trp 抑制的类型及 E4P 的表观 K_m 值

Fig.3 Type of inhibition of L-Trp and K_m value of E4P

1. 0.25mmol / L L-Trp was added;
2. No L-Trp was added.

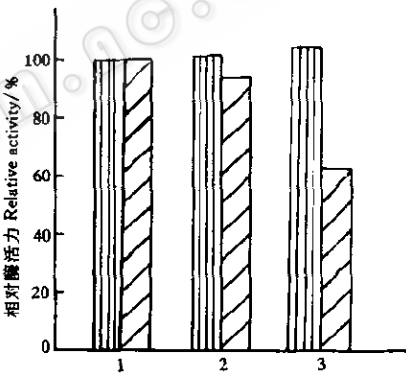


图 4 邻氨基苯甲酸合成酶和 DAHP 合成酶的阻遏

Fig.4 Repression of anthranilate synthase and DAHP synthase

Fig.4 Repression of anthranilate synthase and DAHP synthase

- ▨ DAHP 合成酶 DAHP synthase;
▤ 邻氨基苯甲酸合成酶 Anthranilate synthase
1. No L-Trp was added; 2. 0.3mmol / L L-Trp was added; 3. 1mmol / L L-Trp was added.

Concentration of protein under the three conditions was the same.

L-Trp 生物需求量少, 合成耗能高^[24]。在微生物中, L-Trp 普遍抑制其自身合成支路上的第一个酶邻氨基苯甲酸合成酶活力^[25], 尽管抑制程度有差别^[3]。头状轮生链霉菌中, 1mmol / L L-trp 完全抑制了酶的活性, L-Phe 和 L-Tyr 对此酶均无作用, L-Trp

还能阻遏此酶的合成(图 4), 此结果与地中海拟无枝菌中的情况类似^[3]。实验还表明色氨酸合成支路上的其他四个酶, 邻氨基苯甲酸转磷酸核糖酶、邻氨基苯甲酸磷酸核糖异构酶、吲哚甘油磷酸合成酶和色氨酸合成酶均不受 L-Trp 的阻遏。

分支酸变位酶是 L-Phe、L-Tyr 两合成支路边共同的酶。有的放线菌如诺卡氏菌 239^[19]中, L-Phe 和 L-Tyr 对它都有作用, 也有如 *Streptomyces aureofaciens*^[26]中的不受任何调节。头状轮生链霉菌中, L-Tyr 对它有反馈抑制, 而 L-Phe 无, L-Trp 对此酶也有作用, 三者共同作用时, 分支酸变位酶活力被抑制的程度与 L-Tyr 单独作用时的相仿, L-Trp 和 L-Tyr 反馈抑制的 K_i 值分别为 $2\,500\mu\text{mol/L}$ 和 $5\,000\mu\text{mol/L}$ 。

预苯酸脱水酶是苯丙氨酸合成支路上的第一个酶, 该酶受苯丙氨酸较强抑制, K_i 为 $467\mu\text{mol/L}$, 同时也受 L-Tyr 较弱的抑制, K_i 为 $3125\mu\text{mol/L}$ 。Aro 的作用比二者的单独作用强。此酶不受 L-Trp 的调节。

L-Tyr 支路第一个酶预苯酸脱氢酶的调节在头状轮生链霉菌中较复杂。以 NAD^+ 或以 NADP^+ 为辅酶进行了测试, 两种情况下的调节相似。L-Tyr 对它的抑制较弱,

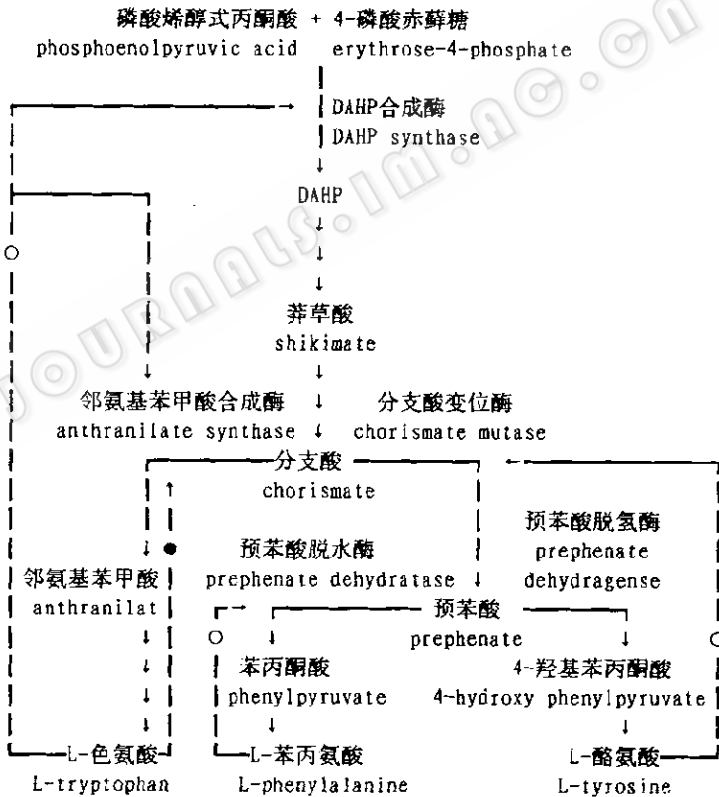


图 5 头状轮生链霉菌中芳香族氨基酸合成途径的调节

Fig.5 Regulation of aromatic amino acids biosynthesis in *Str. caespitosus*

—○→: 反馈抑制 Feedback inhibition;

—●→: 反馈阻遏 Feedback repression.

L-Phe 对它的抑制却极强烈, L-Trp 对此酶也略有作用。L-Tyr 生物合成的 arogenate 途径最初是在蓝绿细菌和铜绿假单胞菌^[27, 28]中发现的, 在几种放线菌中, 苯丙氨酸通过苯丙酮酸合成, 而酪氨酸主要是通过 arogenate 合成^[29]。头状轮生链霉菌中, L-Tyr 是否由 arogenate 途径合成尚待研究。但从预苯酸脱氢酶的调节来看, 其生理功能还有待进一步阐明。

2.3 芳香族氨基酸合成途径的调节

这条途径的三个主要终产物中, L-Trp 的反馈抑制作用最明显, 而且对几个关键酶均起作用, 包括 DAHP 合成酶、邻氨基苯甲酸合成酶、分枝酶变位酶和预苯酸脱氢酶。三种芳香氨基酸中也只有 L-Trp 有阻遏效应。在生物体内, 代谢物的浓度均很低, 因此在离体反应所显示的较弱作用可能在活体内无生理功能。L-Trp 在菌体内其浓度可能远远小于 1 mmol/L, 它对分支酸变位酶和预苯酸脱氢酶较弱的反馈抑制可能不起生理作用而只对 DAHP 合成酶尤其是邻氨基苯甲酸合成酶有作用。根据以上这些结果, 头状轮生链霉菌中芳香族氨基酸合成的调节控制方式如图 5。

参 考 文 献

- [1] Herrmann K M. The common aromatic biosynthetic pathway. In: Somerville ed. *Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation*. London: Addison-Wesley Press, 1983. 301~378.
- [2] Xia T H, Jiao R S. *Biochim Biophys Acta*, 1989, **991**: 1~5.
- [3] Xia T H, Jiao R S. *Biochim Biophys Acta*, 1989, **991**: 6~11.
- [4] Hornemann U et al. Biosynthesis of the mitomycins. In: Corcoran J W ed. *Antibiotics IV "Biosynthesis"*. Berlin: Springer-Verlag Press, 1981. 295~312.
- [5] Gyax D, Ghisalba O, Treichler H et al. *J Antibiot*, 1990, **43**: 324~326.
- [6] 戚天庆, 王立军, 宋庆钧. 抗生素, 1986, **11**(4): 342~345.
- [7] Baker T, Crawford I P. *J Biol Chem*, 1966, **241**: 5577~5584.
- [8] Simpson F J, Perlman A S, Sieben A S. *Methods Enzymol*, 1966, **9**: 35~38.
- [9] Keller E, Lingens F. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1984, **20**: 3~5.
- [10] Gibson F. *Biochem J*, 1964, **90**: 256~261.
- [11] Thomas E. *Methods Enzymol*, 1970, **17**(A): 365~380.
- [12] Wegman J, Crawford I P. *J Bacteriol*, 1968, **95**: 2325~2335.
- [13] Sugimoto S, Shio I. *J Biochem*, 1977, **81**: 823~833.
- [14] Jensen K A, Nester E W. *J Biol Chem*, 1966, **241**: 3365~3372.
- [15] Takahashi M, William C W-C. *Can J Biochem*, 1971, **49**: 1015~1025.
- [16] Gelfand D H, Steinberg A R. *J Bacteriol*, 1977, **130**: 429~440.
- [17] Ahmad S, Weisburg W G, Jensen R A. *J Bacteriol*, 1990, **172**: 1051~1061.
- [18] Cotton R G H, Gibson F. *Biochim Biophys Acta*, 1965, **100**: 76~88.
- [19] Boer L, Brijbloed J W, Grobben G et al. *Arch Microbiol*, 1989, **151**: 319~325.
- [20] Collier R H L, Kolhaw G. *J Bacteriol*, 1972, **112**: 365~371.
- [21] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248~254.
- [22] 夏天辉, 焦瑞身. 抗生素, 1986, **11**(5): 439~443.
- [23] Bracher M, Schweingruber M E. *Biochim Biophys Acta*, 1977, **485**: 446~451.
- [24] Atkinson D E. *Cellular Energy Metabolism and Its Regulation*. New York: Academic Press, 1977. 293.
- [25] Crawford I P. *Bacteriol Rev*, 1975, **39**: 87~120.
- [26] Goerisch H, Lingens F. *Biochemistry*, 1974, **13**: 3790~3794.
- [27] Stenmark S L, Pierson D L, Glover G I et al. *Nature (Lond.)*, 1974, **247**: 290~292.
- [28] Patel N, Pierson D L, Jensen R A. *J Biol Chem*, 1977, **252**: 5839~5846.

[29] Hund H K, Keller B, Lingens F. *Z Naturforsch*, 1987, 42c: 387~393.

REGULATION OF THE BIOSYNTHESIS OF AROMATIC AMINO ACIDS IN *STREPTOVERTICILLIUM CAESPITOSUS*

Cui Fengwen Jiao Ruishen

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

Abstract Studies on regulation of the biosynthesis of aromatic amino acids in *Str. caespitosus* showed that DAHP synthase, the first enzyme of the pathway, had no isoenzyme. Its specific activity could be increased by nitrate. It was not repressed by L-Trp. The enzyme was strongly feedback inhibited by L-Trp but not affected by L-Tyr and L-Phe. The inhibition of L-Trp was noncompetitive with respect to E4P. K_m values for PEP and E4P were 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The enzyme could be stabilized by PEP and Co^{2+} . Anthranilate synthase was completely inhibited by 1mmol/L L-Trp. The enzyme was also repressed by L-Trp, but the rest four enzymes of L-Trp pathway were not. L-Tyr inhibited chorismate mutase. L-Phe inhibited prephenate dehydratase and to a more extent to prephenate dehydrogenase.

Key words *Streptovercillium caespitosus*, Aromatic amino acids, DAHP synthase