

# 北京棒杆菌邻氨基苯甲酸合成酶基因的克隆、序列分析及表达

陈小芳<sup>1,2</sup>, 赵智<sup>1</sup>, 张英姿<sup>1</sup>, 王宇<sup>1</sup>, 丁久元<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(<sup>2</sup> 中国科学院研究生院 北京 100049)

**摘要:**以北京棒杆菌(*Corynebacterium pekinense*)野生株 AS1.299 和突变株 PD-67 的基因组为模板,用 PCR 方法扩增了邻氨基苯甲酸合成酶(AS)基因(*trpEG*)片段和前端控制序列。核酸序列分析结果表明,该片段全长 3374bp,包含 3 个 ORF,推测分别为前导肽基因 *trpL*、AS component I 基因 *trpE* 和 AS component II 基因 *trpG*。*C. pekinense* 野生株 AS1.299 与突变株 PD-67 相比较,*trpL* 基因完全一样;*trpE* 基因有 6 个碱基的突变,导致了 5 个氨基酸残基的改变;*trpG* 基因有 1 个碱基的突变,导致了 1 个氨基酸残基的改变,同时它们在-35 序列处还有一个 A→G 的突变。通过同源性比较发现,*C. pekinense* AS1.299 与 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 和 *Brevibacterium lactofermentum* 的亲缘关系是很近的。*trpL* 基因上游存在启动子区域,并能被 *Escherichia coli* 的 RNA 聚合酶所识别,实现异源互补。野生型和突变型 AS 基因在 *C. pekinense* AS1.299 和 PD-67 中都得到表达,并且重组菌相对于宿主菌的酶活都有了很大提高。摇瓶发酵实验结果表明,带有突变型 AS 基因的 PD-67 重组菌生长比较慢,稳定期比 PD-67 推迟 24h,但产生的 L-色氨酸比 PD-67 高 22.39%。

**关键词:**北京棒杆菌,邻氨基苯甲酸合成酶,L-色氨酸

中图分类号:Q78,Q936 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2007)01-0048-06

L-色氨酸(L-Tryptophan)是人和动物体内的必需氨基酸之一,对人和动物的生长发育,新陈代谢起着重要作用。同时,L-色氨酸也是一些植物蛋白中比较缺乏的氨基酸。因此,L-色氨酸被广泛用于医药、食品和饲料等领域<sup>[1,2]</sup>。

邻氨基苯甲酸合成酶(anthranilate synthetase EC4.1.3.27,AS)是 L-色氨酸合成途径中的第一个酶。在谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)<sup>[3]</sup>和乳糖发酵短杆菌(*Brevibacterium lactofermentum*)<sup>[4,5]</sup>中,该酶基因与 L-色氨酸合成途径中的其它酶基因组成一个操纵子,受阻遏系统和衰减子调控,同时还受 L-色氨酸强烈反馈抑制调控<sup>[6,7]</sup>,是 L-色氨酸合成途径中的关键酶。

北京棒杆菌 AS1.299(*Corynebacterium pekinense* n. sp. AS1.299)是我国研究者分离到的一株革兰氏阳性、无芽孢的产 L-谷氨酸的细菌<sup>[8]</sup>。其突变株 PD-67 为 L-苯丙氨酸完全缺陷型和 L-酪氨酸不完全缺陷型,可积累 L-色氨酸。本文报道了北京棒杆菌 AS1.299 和 PD-67 的 AS 基因序列,AS 基因在北京棒杆菌 AS1.299 和 PD-67 中的表达及基因表达对重组菌生长和产物 L-色氨酸积累的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒** 本实验所用菌株和质粒见表 1。

表 1 实验所用的菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this work

Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
AS1.1047	<i>trpEthi</i>	This lab
<i>Corynebacterium pekinense</i>		
AS1.299	Wild type	This lab
PD-67	* phe <sup>-</sup> tyr <sup>±</sup>	This lab
Plasmids		
pMD18-T	T-vector 2.7kb, Amp <sup>R</sup> , <i>lacZ</i>	TaKaRa Co.
pJCI	6.1kb shuttle-vector, Km <sup>R</sup>	Cremer <i>et al</i> <sup>[9]</sup>
pCX1	3.4kb PCR fragment containing AS1.299 <i>trpEG</i> gene in pMD18-T	This study
pCX3	3.4kb PCR fragment containing PD-67 <i>trpEG</i> gene in pMD18-T	This study
pJW1	3.4kb PCR fragment containing AS1.299 <i>trpEG</i> gene in pJCI	This study
pJW3	3.4kb PCR fragment containing PD-67 <i>trpEG</i> gene in pJCI	This study

\* Phe<sup>-</sup>: no cell growth without phenylalanine addition in minimal medium.  
Tyr<sup>±</sup>: meagre cell growth without tyrosine addition in minimal medium.

**1.1.2 仪器和试剂** 所有分子生物学工具酶均购自 TaKaRa 公司;标准分子量蛋白为中国科学院上海生物化学研究所产品;分支酸购自 Sigma 公司;其余生化药品为进口或国产分析纯试剂;基因扩增仪为 MJ 公司 PTC-150 型基因扩增仪;BIO-RAD MicroPulser<sup>TM</sup>

\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-62554588; E-mail: dingjy@sun.im.ac.cn

作者简介 陈小芳(1979-),女,湖北潜江人,硕士研究生,主要从事氨基酸代谢研究。E-mail: are118@tom.com

其他作者 李开,张春花

收稿日期 2006-05-25,接受日期 2006-06-14,修回日期 2006-07-04

电击仪,721 分光光度计及 BeckmanDU-7 紫外分光光度计。

## 1.2 培养基和培养条件

**1.2.1 培养基:**① LB 培养基<sup>[10]</sup>用于 *E. coli* 培养;② Davis 基本培养基<sup>[11]</sup>中加入 1mg/L 硫胺素用于 *E. coli* 重组菌的筛选;③ LB 培养基加入 1% 葡萄糖和 0.2% 尿素用于培养 *C. pekinense*;④ LB 培养基加入 4% 甘氨酸<sup>[12]</sup>用于制备电击转化用 *C. pekinense* 细胞;⑤ 种子培养基和用于培养细胞制备粗酶液的培养基:每升含葡萄糖 30g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  1g, 尿素 2g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  20mg, 生物素 100 $\mu\text{g}$ , 硫胺素 500 $\mu\text{g}$ ;⑥ 发酵培养基:每升含葡萄糖 80g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  55g, 尿素 3g,  $\text{CaCO}_3$  20g, 其余成分同种子培养基;⑦ 培养 *C. pekinense* PD-67 的基本培养基中加入 0.1mg/mL L-苯丙氨酸和 0.05mg/mL L-酪氨酸。若要制备固体培养基,按 1.3% 的量加入琼脂粉。

**1.2.2 培养条件:***E. coli* 在 37℃ 培养,*C. pekinense* 在 30℃ 培养。抗生素使用浓度为:氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,卡那霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## 1.3 DNA 操作

*E. coli* 质粒提取参照文献[10],*C. pekinense* 质粒提取采用改进碱法。*E. coli* 转化采用  $\text{CaCl}_2$  法,*C. pekinense* 转化采用电击转化法<sup>[12]</sup>。

## 1.4 PCR 扩增

根据同源性,参照 *C. glutamicum* ATCC 13032 *trpEG* 基因序列(GenBank No. BA000036)设计一对引物,分别引入一个酶切位点,用于扩增 *C. pekinense* *trpEG* 基因序列和前端控制序列。正向引物:5'-ATGTCGACCGTGTCCCTGAGGTGCGTAAATC-3';反向引物:5'-TTGGATCCCAGGTGCGAACAGGAAGGTGAA G-3';下划线处分别为 *Sal* I 和 *Bam* H I 酶切位点。PCR 反应条件:94℃ 4min;94℃ 40s;55℃ 1min;72℃ 3min,30 个循环;72℃ 10min。

## 1.5 引物合成及序列分析

引物合成由赛百盛公司完成。DNA 序列测定由 TaKaRa 公司完成。引物设计采用软件 Primer premier5.0。DNA 及蛋白序列分析采用软件 DNAMAN5.0。

## 1.6 AS 活性测定

**1.6.1 粗酶液制备:**将 *C. pekinense* 接于加有葡萄糖和尿素的 LB 培养基 30℃ 摇床培养 24h 后,接种于测酶活用基本培养基,培养 24h 后离心收集菌体。用 50mmol/L Tris-HCl (pH8.0)洗涤两次,悬浮,置冰浴中超声波破碎细胞,离心,上清液用于酶活测定和

蛋白电泳。

**1.6.2 AS 活性测定:**1mL 反应体系含<sup>[6]</sup> 20 $\mu\text{mol}$  谷氨酰胺,10 $\mu\text{mol}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 $\mu\text{mol}$  Tris-HCl (pH8.0),0.2 $\mu\text{mol}$  分枝酸,及适量的粗酶液。30℃ 反应 20min,迅速置于冰上,加入 100 $\mu\text{L}$  1mol/L HCl 终止反应。然后加入 4 倍体积乙酸乙酯提取,静置分层,取上层液体,加入少量无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥,于 336nm 测定光吸收值<sup>[13]</sup>。对照为不加分枝酸的反应液。一个酶活力单位(U)定义为:反应体系中每分钟催化形成 1mmol 邻氨基苯甲酸所需的酶量。

**1.6.3 粗酶液中蛋白含量测定:**采用考马斯亮兰法<sup>[14]</sup>。

## 1.7 L-色氨酸对 AS 的反馈抑制和反馈阻遏实验

在酶活测定反应体系中加入不同浓度的 L-色氨酸,测定 L-色氨酸对 AS 的反馈抑制作用。在酶活测定用基本培养基中加入不同浓度的 L-色氨酸,培养 24h 后收集菌体测定 L-色氨酸对 AS 的反馈阻遏作用。

## 1.8 SDS-PAGE

根据各样品的蛋白浓度,取一定量粗酶液,加入两倍体积样品缓冲液,混合后沸水煮 5min,上样电泳。聚丙烯酰胺胶浓度为 12%。

## 1.9 发酵实验

将 *C. pekinense* 接于加有葡萄糖和尿素的 LB 培养基中培养 24h 后,接种于种子培养基中,培养 24h 后按 6% 的量接入发酵培养基。30℃ 摇床培养,定时取样分析。在波长 600nm 测定菌体生长,DNS 法测定含糖量<sup>[15]</sup>,L-色氨酸含量测定按照文献[16]的方法并加以适当修改。取适量无细胞发酵液以蒸馏水补足到 1mL,加入 2.5mL 9mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  和 0.5mL 3% 的对二甲氨基苯甲醛,混匀,置暗处反应 1h 后加入 100 $\mu\text{L}$  2% 的  $\text{NaNO}_2$ ,再于暗处反应 30min,于 600nm 处测定光吸收值。

## 1.10 质粒稳定性测定

取一定量发酵液用生理盐水稀释到合适浓度,取适量涂布到 LB 平板上,于 30℃ 培养 48h。挑取菌落到 LB 平板和含有卡那霉素抗性的 LB 平板上,培养 48h,计数。质粒保持率定义为,在抗性平板上长出菌落数与在非抗性平板上长出菌落数的百分比值。每一试验随机挑取菌落数大于 100 个。

## 2 结果和分析

### 2.1 *C. pekinense* AS1.299 和 PD-67 AS 基因的 PCR 扩增及重组子鉴定

分别提取 *C. pekinense* AS1.299 和 PD-67 的染色体 DNA 作为模板,各扩增出一条约 3.4kb 大小的

DNA 片段。回收 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接, 转化 *trpE* 基因缺陷型 *E. coli* AS1.1047, 涂布在加有氨基青霉素的 Davis 基本培养基平板上, 异源互补, 挑取转化子, 用 *Bam*H I 和 *Sal* I 进行双酶切, 结果与预期相符。重组质粒分别命名为 pCX1 和 pCX3。

## 2.2 AS 基因序列分析

分别随机挑取带有重组质粒 pCX1 和 pCX3 的各两个阳性克隆, 对插入片段进行测序, 带有相同质粒的两个克隆的结果一致。片段长度为 3374bp, 序列分析显示, 含有 3 个 ORF。第一个 ORF 是前导肽基因 *trpL*, 编码一条 17 个氨基酸残基的多肽, 其中有 3 个串联的色氨酸残基, 起始密码子为 GTG, 终止密码子为 TAA, 在起始密码子上游-10bp 有一可能的核糖体结合位点 AAAG。第二个 ORF 是 AS Component I (AS I) 基因 *trpE*, 编码一条 518 个氨基酸残基的多肽, 推测分子量为 56.4kDa, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA, 在起始密码子上游-5bp 有一可能的核糖体结合位点 AGGTG。第三个 ORF 是 AS Component II (AS II) 基因 *trpG*, 编码一条 208 个氨基酸残基的多肽, 推测分子量为 21.8kDa, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAATAA, 在起始密码子上游-7bp 有一可能的核糖体结合位点 GGAGGT。对 *trpL* 的上游序列进行分析并与已发表的 *C. glutamicum*<sup>[3]</sup> 和 *B. lactofermentum*<sup>[4]</sup> 序列比较, 该区域存在可能的-35 序列、-10 序列和操纵基因, 该操纵基因与-10 序列部分重叠, 形成一个并不十分严格的回文结构(图 1)。而在 *trpL* 和 *trpE* 之间也存在可能的衰减子序列。

```

CTGCGGAAACTACGCAAGAACCACAAAATGATTAATAAATT
GAGACAAGCTCCCACTATGIGATAAAGTCCCAATTTGTG
M
AAT AAC TCT TGT CTC AGT CAA AGC ACC CAG
N N S C L S Q S T Q
TGG TGG TGG CGC GCT AAC TAAGCGACCCCTGA
W W W R A N
  
```

图 1 *C. pekinense* AS1.299 色氨酸操纵子的启动子和 *trpL* 基因的核苷酸序列

Fig.1 Nucleotide sequence of the *C. pekinense* AS1.299 *trp* operon promoter and *trpL*. Potential-35 and-10 boxes are underlined. The presumed operator is in bold type. The probable ribosome-binding site, initiation codon and stop codon are indicated by incontinuous lines, box and shadow box, respectively.

*C. pekinense* AS1.299 与 PD-67 序列比较: *trpL* 基因序列完全一样。 *trpE* 基因的核苷酸序列同源性 99.61%, 有 6 个碱基的差别; 氨基酸序列同源性 99.03%, 有 5 个氨基酸的差别, 分别为: Ala33Ser, Gly46Asp, Gly454Asp, Asn460Ser, Leu508Phe。 *trpG* 基因核苷酸序列同源性 99.84%, 有 1 个碱基的差别;

氨基酸序列同源性 99.52%, 有 1 个氨基酸的差别, Ile108Thr。另外, 它们在-35 序列还有 1 个碱基的差别, TACGCA→TACGCG。

*C. pekinense* AS1.299 的 *trpL* 基因序列与 *C. glutamicum* ATCC 13032 (GenBank No. BA000036) 和 *B. lactofermentum* (GenBank No. X04960) 是完全一致的。 *E. coli* 的色氨酸操纵子作为衰减调控的经典模型, 已被详细报道<sup>[17]</sup>。 *E. coli* 的前导肽由 14 个氨基酸残基组成, 在第 10 位和 11 位有 2 个串联的色氨酸残基, 而 *C. pekinense* AS1.299 的前导肽由 17 个氨基酸残基组成, 在第 12、13 和 14 位有 3 个串联的色氨酸残基。 *trpE* 基因编码区核苷酸序列与 *C. glutamicum* ATCC 13032、*B. lactofermentum* 和 *E. coli* (GenBank No. U00096) 的同源性分别是 98.78%、98.52% 和 49.53%; 而氨基酸同源性分别是 99.42%、99.23% 和 44.13%。 *trpG* 基因编码区核苷酸序列与 *C. glutamicum* ATCC 13032 和 *B. lactofermentum* 的同源性分别是 96.98% 和 97.14%; 而氨基酸同源性分别是 99.52% 和 98.56%。在 *E. coli* 中 AS II 的基因与色氨酸合成途径中的第二个酶氨基苯甲酸磷酸核糖移换酶的基因融合成一个基因, 而在棒杆菌中它是一个独立的基因。由此可见, *C. pekinense* 与 *C. glutamicum* 和 *B. lactofermentum* 的亲缘关系是很近的。 *C. pekinense* 野生株 AS1.299 与突变株 PD-67 的 *trpEG* 基因的核酸序列和前端控制序列已提交 GenBank 登记, 序列号分别是 DQ631967 和 DQ631968。

## 2.3 带 AS 基因的重组质粒 pJW1 和 pJW3 的构建

用 *Sal* I 和 *Bam*H I 双酶切重组质粒 pCX1 和 pCX3, 回收 3.4kb 片段与用相同酶切的穿梭载体 pJC1 得到的大片段相连, 转化 *trpE* 基因缺陷型 *E. coli* AS1.1047, 涂布在加有卡那霉素的 Davis 基本培养基平板上, 挑取转化子。双酶切鉴定重组子, 得到的结果与预期一致, 重组质粒分别命名为 pJW1 和 pJW3。将 *E. coli* AS1.1047、带有空载体 pJC1 和重组质粒 pJW1 和 pJW3 的 *E. coli* AS1.1047 接种于 LB 培养基平板、含有卡那霉素抗性的 LB 培养基平板和 Davis 基本培养基平板上, 37℃ 培养。 *E. coli* AS1.1047 只能在 LB 培养基平板上生长, 带有空载体 pJC1 的 *E. coli* AS1.1047 可以在 LB 培养基平板上和含有卡那霉素抗性的 LB 培养基平板上生长, 但两者都不能在 Davis 基本培养基平板上生长。而带有重组质粒 pJW1 和 pJW3 的 *E. coli* AS1.1047 能在 3 种平板上生长。此结果表明来自 *C. pekinense* 的 AS 基因在 *E. coli* AS1.1047 中得到表达, 实现了异源互补。由于 pJC1 载体本身无启动子, AS 基因

的表达表明插入片段中确实存在启动子序列,该启动子也可以被 *E. coli* 的 RNA 聚合酶所识别。

### 2.4 L-色氨酸对 AS 的反馈抑制和反馈阻遏作用

对 *C. pekinense* AS1.299 和 PD-67 的 AS 活性分别进行了测定,PD-67 的比活力 93.69U/mg,而 AS1.299 检测不到酶活。在反馈抑制实验中,L-色氨酸浓度在 0~15mmol/L,PD-67 AS 活性几乎无变化。阻遏实验中,L-色氨酸浓度在 0~500 $\mu$ g/mL,PD-67 AS 活性几乎没有变化。Hiroshi 等<sup>[6]</sup>的工作表明,在 *C. glutamicum* 的反馈抑制实验中,当 L-色氨酸浓度达到 3 $\mu$ mol/L 时,AS 活性被抑制了 50%,当 L-色氨酸浓度达到 50 $\mu$ mol/L 时,酶活几乎被完全抑制,而在阻遏实验中,在加有 500 $\mu$ g/mL 色氨酸的基本培养基中生长的菌的酶活只有在加有 5 $\mu$ g/mL 色氨酸的培养基中的菌的 19%。在 *B. flavum* 的反馈抑制实验中,当 L-色氨酸浓度达到 1.5 $\mu$ mol/L 时,AS 活性被抑制了 50%,当 L-色氨酸浓度达到 10 $\mu$ mol/L

时,酶活几乎被完全抑制,而在阻遏实验中,在加有 500 $\mu$ g/mL 色氨酸的基本培养基中生长的菌的酶活只有在加有 10 $\mu$ g/mL 色氨酸的培养基中的菌的 3.5%<sup>[7]</sup>。虽然我们没有得到 AS1.299 的酶活数据,但在反馈抑制实验中使用的 L-色氨酸的浓度已远远高于类似实验中使用的浓度。综合以上的数据,我们推断 PD-67 的 AS 解除了反馈抑制和阻遏作用。

### 2.5 *C. pekinense* 重组菌 AS 活性

将质粒 pJCl、pJW1 和 pJW3 分别电击转化 *C. pekinense* AS1.299 和 PD-67,得到 *C. pekinense* 重组菌。对这些菌的 AS 活性分别进行了测定,结果表明(表 2),重组菌相对于宿主菌的酶活都有了很大提高。PD-67(pJW1)比 PD-67 的酶活提高了近 55 倍,PD-67(pJW3)比 PD-67 的酶活提高了近 9 倍,而 AS1.299(pJW1)和 AS1.299(pJW3)也有检测出的酶活。因此,AS 基因在宿主菌中都有效表达。

表 2 各菌株的 AS 比活力

Table 2 The specific activity of AS of different strains

	PD-67	PD-67(pJCl)	PD-67(pJW1)	PD-67(pJW3)	AS1.299(pJW1)	AS1.299(pJW3)
AS(U/mg)	93.96	92.31	5144	809	18.68	13.48

### 2.6 *C. pekinense* PD-67 重组菌的 SDS-PAGE

为了检测 AS 基因在 *C. pekinense* PD-67 中的表达水平,我们对粗酶液进行了 SDS-PAGE 分析。从图 2 可以看出重组菌 PD-67(pJW1)和 PD-67(pJW3)在 56kDa 处有明显加深的条带,而在 22kDa 左右的位置没有加深的条带,但在其上方有一条加深的条带。该条带是否为 AS II 的条带还需进一步的验证。

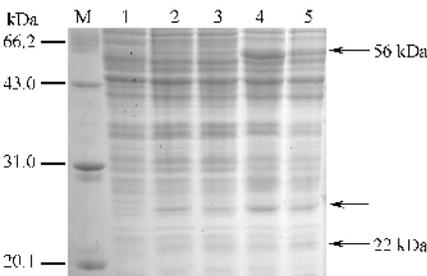


图 2 各菌株蛋白粗提液的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of crude extracts of different strains of *C. pekinense*. M: protein marker; 1: *C. pekinense* AS1.299; 2: *C. pekinense* PD-67; 3: *C. pekinense* PD-67(pJCl); 4: *C. pekinense* PD-67(pJW1); 5: *C. pekinense* PD-67(pJW3).

### 2.7 过表达 AS 基因对生长和 L-色氨酸积累的影响

为研究 AS 活性的增加对重组菌株生长以及 L-色氨酸积累的影响,我们用基本培养基进行了摇瓶发酵实验(图 3)。发酵结果表明,PD-67(pJW3)的生长比较慢,达到稳定期的时间比 PD-67 推迟 24h。与生长相对应,PD-67(pJW3)的糖耗速度也明显低于

PD-67。它们基本上都在达到稳定期的时候耗糖完毕,稳定期后 12h 产酸达到最高值,分别为 3.28g/L 和 2.68g/L,PD-67(pJW3)产酸比 PD-67 高 22.39%。两者在发酵过程中都没有过量邻氨基苯甲酸产生。质粒稳定性的试验结果表明,PD-67(pJW3)在 108h 的质粒保持率为 95%。

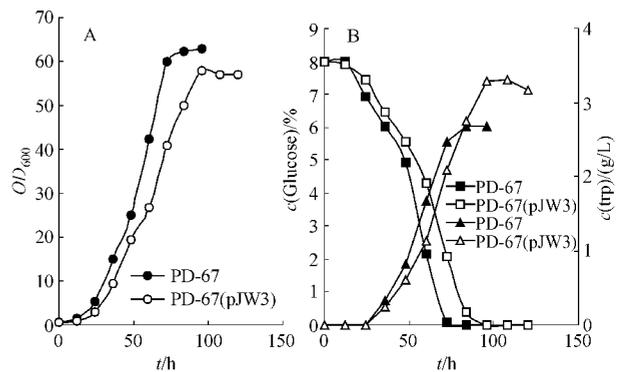


图 3 L-色氨酸发酵过程

Fig.3 The time course of fermentation of L-Tryptophan. A: The cell growth profiles of different strains; B: The L-Tryptophan production and glucose consumption profiles of different strains.

## 3 讨论

在目前已研究的 AS 中,大多数 AS 都是由两条不同的多肽链按一定的方式组成的寡聚体。AS I 催化分枝酸生成邻氨基苯甲酸,存在结合 L-色氨酸

的别构部位和结合分枝酸的催化部位;AS II 属于 *trp* glutamine amidotransferase 家族,为 AS I 的反应提供游离的氨基。Thorsten 等<sup>[18]</sup>报道了 *S. solfataricus* (AS I)<sub>2</sub>(AS II)<sub>2</sub> 复合物的晶体结构,并对其功能进行了预测。AS I 的构象中存在两个结构域和一个裂缝。通过定点突变实验鉴定的对催化活性必须的 6 个保守氨基酸残基,分别位于裂缝的顶部(Thr243、Asp266 和 His306)和底部(Thr333、Gly393 和 Glu403),而这 6 个氨基酸残基在 *C. pekinense* 中也存在(Thr325、Asp351、His394、Thr421、Gly481 和 Glu491),并且没有发生突变。AS II 中的 Cys84、His175 和 Glu177 组成催化部位,并且 Cys84 采取能量不稳定的构象,与 Gln 作用形成谷氨酰胺中间物。Cys 和 His 的功能在 *S. marcescens* (Cys84, His170)<sup>[19,20]</sup>、*P. putida* (Cys79)<sup>[21]</sup> 和 *L. biflexa* (Cys89)<sup>[22]</sup> 也得到了证实,这 3 个氨基酸残基同样存在于 *C. pekinense* (Cys80、His185 和 Glu187) 中。

Roney 等<sup>[23]</sup>对 *S. cerevisiae* AS 反馈抑制抗性突变株研究后得出结论,AS I 的 N 端存在保守区域-LLESX<sub>10</sub>S-Ser65 或 Ser76 突变都会导致对 L-色氨酸反馈抑制的不敏感。该区域在 *B. lactofermentum* 和 *C. pekinense* 中都存在,并且在 *B. lactofermentum* 的-LLES-中的 Ser38 突变会导致对 L-色氨酸反馈抑制的抗性<sup>[24]</sup>。在 *C. pekinense* PD-67-LLESX<sub>10</sub>S-区域有一个突变 Gly46Asp,并且在该区域前面两个氨基酸残基处还有一个突变 Ala33Ser,可能这两个突变解除了 L-色氨酸的反馈抑制作用。Mauree 等<sup>[25]</sup>鉴定了一个 *S. typhimurium* AS I 突变位点 Cys465,该突变同时导致了反馈抑制抗性和对分枝酸亲和力的下降,他们推断在蛋白的折叠构象中,这个突变的位点同时破坏了别构部位和催化部位。Cys461 存在于 *C. pekinense* PD-67,但在其前面一个氨基酸残基处发生了一个突变 Asn460Ser,这个突变可能存在相同的效应。*C. pekinense* AS II 中也存在保守的氨基酸序列-DXXDSP(8~13)-PGP(52~54)-HG(101~102)-RYHSL(142~146)和-FHPFS(84~88),并且没有发生突变<sup>[22]</sup>。PD-67 AS II 中有一个突变 Ile108Thr,而在 *C. glutamicum*、*B. lactofermentum* 和 *E. coli* 中该位置均为 Ile,该突变导致了怎样的结果还有待进一步研究。

对比 PD-67 重组菌和 AS1.299 重组菌的酶活数据,PD-67 重组菌的酶活要比 AS1.299 重组菌的高很多。由于 PD-67 是经过多次诱变的,很可能它在 L-色氨酸合成调控系统上还存在其它的突变,例如阻遏蛋白失活或 RNA 聚合酶更易起始转录,导致 AS 过量表达。而 AS1.299 是野生型菌株,存在严格

的表达调控系统,再加上质粒 p<sub>JC1</sub> 是克隆载体,没有诱导表达体系,因而 AS1.299 重组菌的酶活比较低。在蛋白电泳图谱中,PD-67(p<sub>JW3</sub>)的表达量比 PD-67(p<sub>JW1</sub>)低,可能是细胞基于平衡生长的需要,对 AS 的酶活性进行调整,在 L-色氨酸合成调控系统上出现正突变的同时进行负调控,PD-67 启动子-35 序列的突变可能有降低表达的作用。PD-67(p<sub>JW1</sub>)的酶活比 PD-67(p<sub>JW3</sub>)高几倍,可能是由于 PD-67(p<sub>JW3</sub>)表达量降低的原因,也可能是 Asn460Ser 的突变,导致 AS 对分枝酸亲和力的下降。

在发酵实验中,PD-67(p<sub>JW1</sub>)的结果是出乎意料的(数据没有列出),PD-67(p<sub>JW1</sub>)在生长的初期比较慢,36h 后生长加快,稳定期的生物量比 PD-67 大,但产生的 L-色氨酸比 PD-67 低 32%。这说明太高的酶活并不会使产物产量增加。我们也对 AS1.299 重组菌进行了发酵实验,AS1.299 重组菌产生了大量的邻氨基苯甲酸:AS1.299(p<sub>JW1</sub>)菌体 OD 达到 60 时,产生邻氨基苯甲酸 3.67g/L;AS1.299(p<sub>JW3</sub>)菌体 OD 达到 60 时,产生邻氨基苯甲酸 3.71g/L,没有 L-色氨酸产生。从 AS1.299 重组菌发酵结果可以看出,AS 基因扩增可以增加导向 L-色氨酸的代谢流,同时也说明这时 L-色氨酸途径中的第二个酶成了产酸的瓶颈。对比 PD-67(p<sub>JW3</sub>)与 PD-67 的产酸量,PD-67(p<sub>JW3</sub>)仅比 PD-67 的 L-色氨酸增加了 0.6 g/L,比 AS1.299 重组菌产生的邻氨基苯甲酸少很多。有一种可能是 L-色氨酸合成途径中的其它酶反应成了限速步骤,积累了其它中间产物。Shin-ichi 等报道在 *B. flavum* 中,色氨酸合成途径中的第二个酶氨基苯甲酸磷酸核糖转移酶<sup>[26]</sup>和最后一个酶色氨酸合酶<sup>[27]</sup>也受 L-色氨酸反馈抑制,但不如 AS 强烈。也有可能 PD-67(p<sub>JW3</sub>)的高酶活有关,酶活与 L-色氨酸产量的关系可能表现为钟形曲线,存在一个最适酶活值。

## 参 考 文 献

- [1] 吴夏英,杨青. 色氨酸基因工程进展. 微生物学报, 1993, 20(2):107-109.
- [2] 陈涛,陈宁. L-色氨酸的生产及其代谢控制育种. 生物技术通讯 2000, 11(2):141-145.
- [3] Heery DM, Dunican LK. Cloning of the *trp* gene from a tryptophan-hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*: Identification of a mutation in the *trp* leader sequence. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(3):791-799.
- [4] Konosuke S, Kazuhiko M. Structure and function of the *trp* operon control regions of *Brevibacterium lactofermentum*, a glutamicum-producing bacterium. *Gene*, 1987, 53:191-200.
- [5] Kazuhiko M, Konosuke S, Eiichi O. Sequence analysis of the *Brevibacterium lactofermentum trp* operon. *Mol Gen Genet*, 1987,

- [ 6 ] Hiroshi H, Kiyoshi N. Regulatory properties of anthranilate synthetase from *Corynebacterium glutamicum*. *Agri Boil Chem*, 1974, **39**( 2 ) :323 – 330.
- [ 7 ] Isamu S, Ryuichi M, Michiko N. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. I Regulation of anthranilate synthetase. *J Biochem*, 1972, **72**( 6 ) :1447 – 1455.
- [ 8 ] 陈琦, 张震元, 李玲阁. 产生 L-谷氨酸的棒状杆菌新种. *微生物学报*, 1973, **13**( 1 ) :1 – 6.
- [ 9 ] Cremer J, Eggeling L, Sahn H. Cloning of the *dapA dapB* cluster of *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Gen Genet*, 1990, **220** :478 – 480.
- [ 10 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [ 11 ] David ET, James P. Hyperproduction of tryptophan by *Escherichia coli*: genetic manipulation of the pathways leading to tryptophan formation. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **38**( 2 ) :181 – 190.
- [ 12 ] 沈天翔, 那淑敏, 肖文中, 等. 棒状类细菌电击转化中多种条件对转化效率的影响. *生物工程学报*, 1995, **11**( 3 ) :245 – 249.
- [ 13 ] Gibson MI, Gibson F. Preliminary studies on the isolation and metabolism of intermediate in aromatic biosynthesis: chorismic acid. *Biochem J*, 1964, **90** :248 – 256.
- [ 14 ] Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72** :248 – 254.
- [ 15 ] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1997.
- [ 16 ] Gunnar SS, Jan-eric S. Factors affecting the biosynthesis of L-tryptophan by genetically modified strains of *Escherichia coli*. *J General Microbio*, 1984, **130** :3091 – 3100.
- [ 17 ] Charles Y. Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature*, 1981, **289** :751 – 758.
- [ 18 ] Thorsten K, Andreas I, Gerko H, et al. The crystal structure of anthranilate synthase from *Sulfolobus solfataricus*: Functional implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**( 17 ) :9479 – 9484.
- [ 19 ] Janet LP, Howard Z, David B, et al. Study of anthranilate synthase function by replacement of cysteine 84 using site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 1985, **260**( 3 ) :1989 – 1894.
- [ 20 ] Naoki A, Janet LP, Howard Z. Replacement by site-directed mutagenesis indicate a role for histidine 170 in the glutamine amide transfer function of anthranilate synthase. *J Biol Chem*, 1985, **260**( 27 ) :14844 – 14849.
- [ 21 ] Masaru K, Pamela SK, Yoshitaka G, et al. Anthranilate synthetase component II from *Pseudomonas putida*. *J Biol Chem*, 1978, **253**( 13 ) :4659 – 4668.
- [ 22 ] David BY, Stanford LP. Identification and nucleotide sequence of the *Leptospira biflexa* serovar *patoc* *trpE* and *trpG* genes. *J Bacteriol*, 1989, **171**( 4 ) :2083 – 2089.
- [ 23 ] Roney G, Brigitta M, Gerhard HB. Analysis of feedback-resistant anthranilate synthases from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1993, **175**( 4 ) :1061 – 1068.
- [ 24 ] Kazuhiko M, Kiyoshi M, Konosuke S. Two single-base-pair substitutions causing desensitization to tryptophan feedback inhibition of anthranilate synthase and enhanced expression of tryptophan genes of *Brevibacterium lactofermentum*. *J Bacteriol*, 1987, **169**( 11 ) :5330 – 5332.
- [ 25 ] Maureen GC, Ronald B. Identification of amino acid residues involved in feedback regulation of the anthranilate synthase complex from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*, 1991, **266**( 13 ) :8328 – 8335.
- [ 26 ] Shin-ichi S, Isamu S. Regulation of tryptophan biosynthesis by feedback inhibition of the second-step enzyme, anthranilate phosphoribosyl-transferase, in *Brevibacterium flavum*. *Agri Boil Chem*, 1983, **47**( 10 ) :2295 – 2305.
- [ 27 ] Shin-ichi S, Isamu S. Tryptophan synthase and production of L-tryptophan in regulatory mutants. *Agri Boil Chem*, 1982, **46**( 11 ) :2711 – 2718.

## Cloning, sequence analysis and expression of anthranilate synthetase gene in *Corynebacterium pекinense*

CHEN Xiao-fang<sup>1, 2</sup>, ZHAO Zhi<sup>1</sup>, ZHANG Ying-zi<sup>1</sup>, WANG Yu<sup>1</sup>, DING Jiu-yuan<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(<sup>2</sup> Graduate school of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** Anthranilate synthetase (EC4.1.3.27; AS) genes from wild-type *Corynebacterium pекinense* AS1.299 and its mutant PD-67 were cloned and sequenced. Analysis of PCR fragments revealed that three ORFs existed, which corresponded to *trpL*, *trpE* and *trpG* gene, respectively. Six bases changes that resulted in the changes of five amino acids were found in the *trpE* structural gene of *C. pекinense* PD-67 and a single-base change that resulted in an amino acid substitution was found in the *trpG* structural gene of *C. pекinense* PD-67. A homology comparison revealed that *C. pекinense* AS1.299 was closely related to *Corynebacterim glutamicum* ATCC 13032 and *Brevibacterium lactofermentum*. An internal promoter was found in the upstream of the *trpL* gene from *C. pекinense* and it functioned in *E. coli*, but a single-base exchange (A to G) existed in the -35 box of PD-67. The *trpEG* genes from the wild-type strain and its mutant were expressed both in *C. pекinense* AS1.299 and PD-67, and the specific enzyme activities of transformed *C. pекinense* were much higher than that of the parental strains. The amplification of the activity of AS yielded 22.39% increase of L-tryptophan production, but the cell growth became slower than PD-67.

**Keywords**: *Corynebacterium pекinense*; Anthranilate synthetase; L-tryptophan

\* Corresponding author. Tel/Fax: 86-10-62554588; E-mail: dingjy@sun.im.ac.cn

Other authors: LI Kai, ZHANG Chun-hua

Received 25 May 2006/Accepted 14 June 2006/Revised: 4 July 2006

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>