

人和动物胃肠道微生物丁酸合成途径相关酶基因的研究进展

李劲亭, 刘力, 戴欣*

微生物资源前期开发国家重点实验室, 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

摘要:人和动物胃肠道中都栖息了大量的产丁酸微生物。研究表明,参与丁酸合成中心途径的酶基因成簇存在,其相关基因的排列形式多样并具有属种特异性。参与丁酸合成最后一步的(丁酰辅酶 A/乙酸)辅酶 A (CoA) 转移酶在胃肠道产丁酸微生物中广泛存在,并在丁酸合成中发挥重要作用。本文结合我们的研究工作,综述了国内外丁酸合成相关酶基因和基因簇的最新研究进展。

关键词:胃肠道微生物, 丁酸合成, 基因/基因簇, (丁酰 CoA: 乙酸) CoA 转移酶

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 10-1181-06

人和动物胃肠道中都栖息了大量的产丁酸微生物, 主要为梭菌 (*Clostridium*)、真杆菌 (*Eubacterium*)、粪球菌 (*Faecalibacterium*)、丁酸弧菌 (*Butyrivibrio*) 和巨球形菌 (*Megasphaera*) 等厚壁菌类群 (*Firmicutes*)^[1-3], 这些微生物及其发酵产物丁酸对宿主有着重要的意义。人类肠道产丁酸菌已被证实对人类的健康有重要的作用, 这些产丁酸菌为人肠上皮细胞提供能量并能显著提高人类免疫力^[4-5]; 反刍动物瘤胃中微生物合成的丁酸和乙酸, 是乳脂肪合成最重要的前体物, 其含量不仅显著影响瘤胃微生物的群落结构^[6], 还直接通过影响乳脂肪的含量而影响乳品质量。因此对瘤胃微生物的丁酸合成途径、关键酶基因及其可能的调控机制研究也为提高反刍动物乳品质提供新的视角和线索。

近年来, 对胃肠道产丁酸微生物丁酸合成途径相关酶基因的研究深入开展, 2006 年 Charier 等分离纯化了一种新的(丁酰 CoA: 乙酸) CoA 转移酶^[7], 完善了丁酸合成的新途径。2009 年 Louis 等

分析了人肠道产丁酸菌丁酸合成中心途径的关键酶基因簇, 发现了多种具有种属特异性的排列方式^[1]。本文结合我们的研究工作, 重点从丁酸合成关键酶基因簇的排列和分布、(丁酰 CoA: 乙酸) CoA 转移酶在胃肠道的广泛存在等方面, 对国内外最新的研究进展进行了综述。

1 丁酸合成途径及相关酶

丁酸的发酵分为 2 个阶段, 即从乙酰 CoA 到丁酰 CoA 的中心途径 (central pathway) 和从丁酰 CoA 到丁酸的最后一步 (the last step)。中心途径在不同丁酸产生菌中基本相同, 从丁酰 CoA 到丁酸的最后一步则有两种途径: 一是传统认为的, 在丁酰磷酸转移酶 (phosphotransbutyrylase) 和丁酸激酶 (butyrate kinase) 的作用下, 通过丁酰磷酸生成丁酸^[8]; 另一种途径是近年新发现的, 在乙酸存在时通过(丁酰 CoA: 乙酸) CoA 转移酶 (butyryl-CoA: acetate CoA-

基金项目: 国家重点研究基础计划 (国家“973 项目”) (2011CB100804)

* 通信作者。Tel: +86-10-64807418; Fax: +86-10-64807429; E-mail: daixin@im.ac.cn

作者简介: 李劲亭 (1985 -), 男, 山东枣庄人, 硕士研究生。E-mail: ltting@163.com

收稿日期: 2012-04-10; 修回日期: 2012-06-26

transferase) 的作用把丁酰 CoA 的 CoA 转给乙酸从而生成丁酸和乙酰 CoA^[9-10] (图 1)。

1999 年 Diez-Gonzalez 等首次发现人肠道丁酸合成微生物中具有(丁酰 CoA: 乙酸) CoA 转移酶活性的存在^[9], 直到 2006 年 Charier 等才在产丁酸的罗斯拜瑞氏菌属 *Roseburia sp.* A2-183 中分离纯化了(丁酰 CoA: 乙酸) CoA 转移酶^[10]。由于该菌中没有

其他和丁酸合成相关的 CoA 转移酶, 因此推断该酶是丁酸合成的关键酶。对该酶的异源表达和活性分析发现, 它具有比较宽泛的底物特异性, 以丁酰 CoA 为底物时活性最强, 以丙酰 CoA 为底物是也有一定的活性, 能将乙酸、丁酸、丙酸、异丁酸和戊酸作为 CoA 的受体。

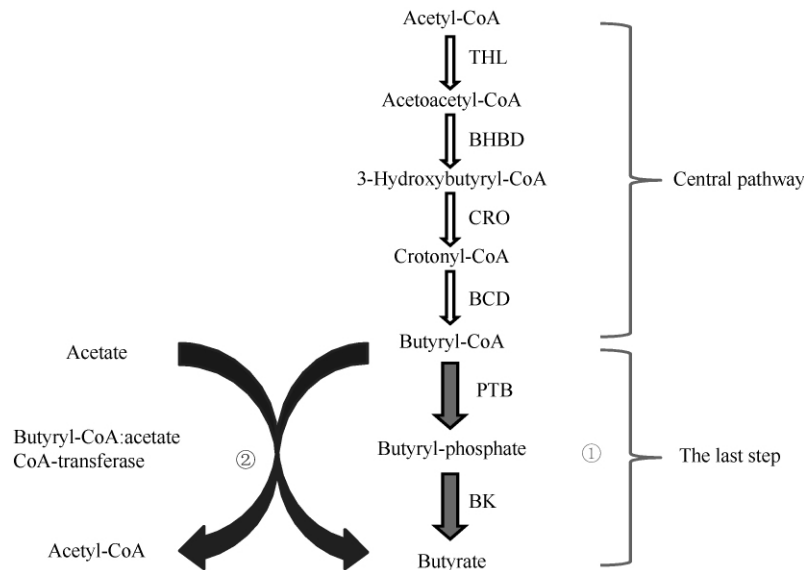


图 1 丁酸合成途径

Fig1 The butyrate producing pathway from acetyl-CoA. BCD, butyryl-CoA dehydrogenase; BHBD, b-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; CRO, crotonase; THL, thiolase; PTB, phosphotransbutyrylase; BK, butyrate kinase.

2 丁酸合成中心途径(乙酰 CoA 到丁酰 CoA) 基因簇排列方式的多样性

结合我们对产丁酸微生物基因组的分析表明, 目前发现的微生物丁酸合成中心途径相关酶基因的成簇排列方式共有 7 种(图 2)。其中 A 和 B 是 Asanuma 等(2003, 2005)发现的溶纤维丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)丁酸合成中心途径的 4 个关键酶基因(*thl*, *bhbd*, *cro*, *bcd*)的排列特征(图 2-A、B), 这些基因组成一个多顺反子进行共转录和调控, 其转录不受培养条件中乙酸浓度的影响^[11-12]。

图 2A-E 是 Louis 等(2009)分析汇总的人类肠道产丁酸菌的丁酸合成关键酶基因排列的情况, 即在不同的梭菌类群(I、IV、XV、XVI、XIVa)中, 中心途径酶基因存在五种不同的排列方式, 这种排列方式与基于 16S rRNA 基因的分类结果一致, 可作为

分类的重要参考依据^[1]。

我们对包括瘤胃微生物在内的已完成全基因组测序的胃肠道产丁酸菌全基因组序列进行分析, 发现在梭菌类群 XIb 艰难梭菌(*Clostridium difficile* 630, 人来源)的基因组中, 还存在一种新的中心途径酶基因的排列方式, 见图 2-F。另外在非胃肠道来源的热产硫磺好热厌氧小杆菌(*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* DSM 571)基因组中存在一种新的排列方式(图 2-G)。这些不同的梭菌类群具有的不同中心途径基因的排列方式, 与其丁酸合成表达调控方式和合成效率之间的相关性有待进一步探讨。

3 丁酸合成中心途径与最后一步相关酶基因在基因组上的分布特点

我们对不同类群产丁酸梭菌的丁酸合成中心途

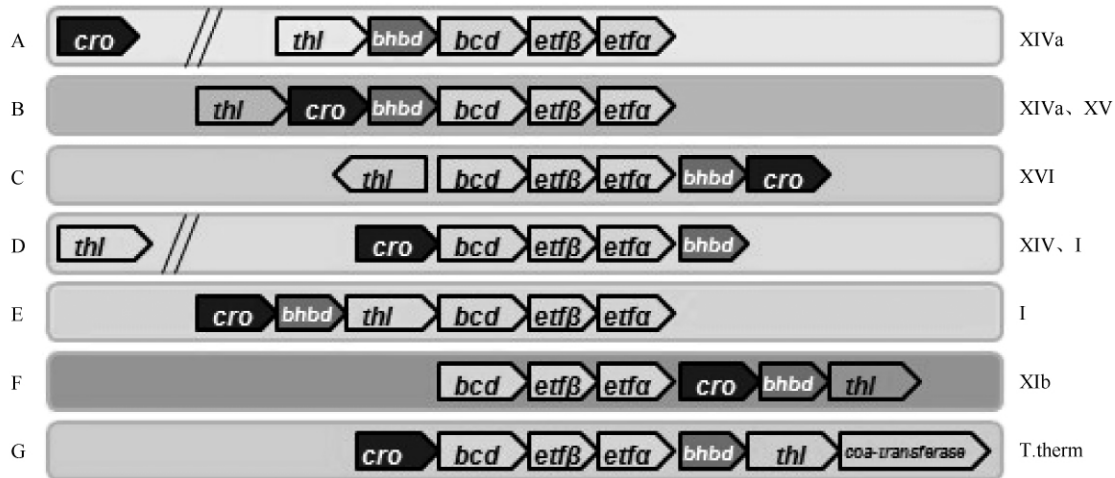


图2 丁酸合成中心途径关键酶基因不同排列方式及所在的细菌类群

Fig.2 The different gene arrangement of the central pathway and their bacteria group. *bcd*, gene encoding butyryl-CoA dehydrogenase; *bhbd*, gene encoding b-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; *cro*, gene encoding crotonase; *etfa*, gene encoding electron transfer protein a; *etfβ*, gene encoding electron transferprotein b; *thl*, gene encoding thiolase; I, IV, XV, XVI, XIVa and XIb represent different Clostridial cluster; T. therm, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* DSM 571.

径基因簇上下游基因进行分析,未发现(丁酰 CoA:乙酸) CoA 转移酶或者丁酸激酶/丁酰磷酸转移酶基因,说明在这些菌中,丁酸合成中心途径的基因簇与最后一步的酶在基因组上分处不同的位置。

Louis 等(2004)分析了3株人肠道丁酸产生菌:丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum* ATCC924)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens* 13)和破伤风梭菌(*Clostridium tetani* E88)中的丁酰磷酸转移酶和丁酸激酶基因,发现这两个基因成对存在,且不与中心途径的酶基因簇相邻排列^[13],这也和我们的分析结果一致。

Louis 等(2007)分析了4株人肠道丁酸产生菌:人罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis* A2-183)、霍氏真杆菌(*Eubacterium hallii* L2-7)、普氏栖粪杆菌(*Faecalibacterium prausnitzii* A2-165)和粪厌氧棒状菌(*Anaerostipes caccae* L1-92)中的(丁酰 CoA:乙酸) CoA 转移酶基因,发现该基因在它们基因组上的位置各不相同,分别位于由乳酸脱氢酶、假定膜蛋白、分泌蛋白、转录调控因子等组成的不同基因簇中,由此推测这些微生物中(丁酰 CoA:乙酸) CoA 转移酶可能是通过基因水平转移而被丁酸产生菌获得的,环境中的乙酸作为选择压力促进了这个过程^[14]。

我们发现在分离自变质罐头食品的热产硫磺好热厌氧小杆菌(*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* DSM 571)基因组中,(丁酰

CoA:乙酸) CoA 转移酶基因与中心途径的基因簇相邻排列(图2-G)。该酶与已报道的(丁酰 CoA:乙酸) CoA 转移酶氨基酸序列相似性较低,我们推测这种排列方式可能意味着新的丁酸合成调控模式。

4 (丁酰 CoA:乙酸) CoA 转移酶在动物胃肠道中的广泛存在

尽管(丁酰 CoA:乙酸) CoA 转移酶活性是近年来才在胃肠道产丁酸微生物中发现的,但是越来越多的研究证明该酶及其对应的合成途径在动物胃肠道中分布广泛。

Louis 等(2004)对38株人类肠道产丁酸菌(分属于梭菌 IV, XIVa, and XVI)的分析结果表明,它们全部具有(丁酰 CoA:乙酸) CoA 转移酶活性,却只有4株具有丁酸激酶活性,即这4株菌同时具有两种酶活性,由此推测人类肠道产丁酸菌中 CoA 转移酶途径占主要地位^[13], Muñoz-Tamayo 等(2011)的实验也支持这一观点^[15]。Louis 等(2010)设计(丁酰 CoA:乙酸) CoA 转移酶基因保守引物对人胃肠道总 DNA 进行 PCR 扩增,获得了1,718条序列,分属于32个不同的分类单元(OTU),揭示了人肠道(丁酰 CoA:乙酸) CoA 转移酶序列的多样性^[16],并且(丁酰 CoA:乙酸) CoA 转移酶在不同年龄和不同饮食状况人的肠道中丰度不同^[16-18]。

Paillard 等(2007)对 45 株瘤胃丁酸弧菌进行丁酸合成相关基因的分析,发现约一半菌株具有丁酸激酶基因,另一半则只具有(丁酰 CoA:乙酸) CoA 转移酶基因,且没有一个菌株同时具有两种酶基因。表明(丁酰 CoA:乙酸) CoA 转移酶在瘤胃微生物丁酸合成中的重要贡献^[19]。

Eeckhaut V 等(2011)对鸡肠道的厚壁菌门产丁酸菌进行了研究,分离了 16 株产丁酸菌。其中 1 株扩增到了丁酸激酶基因,8 株扩增出(丁酰 CoA:乙酸) CoA 转移酶基因,说明在鸡肠道丁酸合成中,(丁酰 CoA:乙酸) CoA 转移酶介导的途径占优势^[20]。

刘威等(2007)从猪粪便中分离到一株乳酸利用、丁酸产生双重功能菌株,该菌株在乙酸为唯一碳源时不能生长,而在有葡萄糖的情况下,能够利用乙酸并生成丁酸,因此推测该菌中可能含有(丁酰 CoA:乙酸) CoA 转移酶途径,进一步推测猪肠道中也有(丁酰 CoA:乙酸) CoA 转移酶发挥作用^[21]。

综合以上的研究表明,(丁酰 CoA:乙酸) CoA 转移酶途径在动物肠道中广泛存在,并且它对丁酸合成的贡献甚至可能超过丁酸激酶,我们最近完成的瘤胃元转录组测序分析结果也支持了这一观点(未发表)。对于不同动物肠道来源的产丁酸菌在这两种丁酸合成途径的选择及偏好性等,有待更多实验证实。

5 展望

传统认为产丁酸菌主要存在于低 G + C 含量革兰氏阳性菌(*Firmicutes*)类群中,但近年来陆续报道在紫单胞菌科(*Porphyromonadaceae*)等拟杆菌(*Bacteroidetes*)类群革兰氏阴性菌中发现产丁酸微生物,包括来自犬牙龈的内脏臭气杆菌(*Odoribacter splanchnicus* DSM 20712)^[22]和来自鼠粪便的新属 *Butyricimonas synergistica* 和 *Butyricimonas virosa*^[23]。我们在 *Odoribacter splanchnicus* DSM 20712 的基因组中发现丁酸合成中心途径基因和 CoA 转移酶基因相邻排列(未发表),由于该菌能产生大量丁酸,因此推测这可能是拟杆菌类群产丁酸菌不同于厚壁菌类群的丁酸合成相关基因的排列特点。

尽管胃肠道中已经分离培养了大量的产丁酸菌,并且发现了两种丁酸合成途径:丁酸激酶途径和

(丁酰 CoA:乙酸) CoA 转移酶途径。但是这些菌及这两种途径在丁酸合成中贡献以及它们的调控机制都不清楚,我们认为这些问题的解决有赖于元转录组学技术的发展,目前我们正在进行奶牛瘤胃元转录组的研究,并且已经获得了大量的数据(未发表)。我们相信随着微生物纯培养技术的进步和元基因组学/元转录组学的发展,会进一步拓宽我们对丁酸合成途径及丁酸相关合成基因/基因簇的认识。

参考文献

- [1] Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 294 (1):1-8.
- [2] Maia MR, Chaudhary LC, Figueres L, Wallace RJ. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2007, 91 (4):303-314.
- [3] Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 217 (2):133-139.
- [4] Mai V, Draganov PV. Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. *World Journal of Gastroenterology*, 2009, 15 (1):81-85.
- [5] Van Immerseel F, Ducatelle R, De Vos M, Boon N, Van De Wiele T, Verbeke K, Rutgeerts P, Sas B, Louis P, Flint HJ. Butyric acid-producing anaerobic bacteria as a novel probiotic treatment approach for inflammatory bowel disease. *Journal of Medical Microbiology*, 2010, 59 (2):141-143.
- [6] Li RW, Wu S, Baldwin RL, Li W, Li C. Perturbation dynamics of the rumen microbiota in response to exogenous butyrate. *PLoS One*, 2012, 7 (1): e29392.
- [7] Charrier C, Duncan GJ, Reid MD, Rucklidge GJ, Henderson D, Young P, Russell VJ, Aminov RI, Flint HJ, Louis P. A novel class of CoA-transferase involved in short-chain fatty acid metabolism in butyrate-producing human colonic bacteria. *Microbiology*, 2006, 152 (2): 179-185.
- [8] Miller TL, Jenesel SE. Enzymology of butyrate formation by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Bacteriology*, 1979, 138 (1):99-104.

- [9] Diez-Gonzalez F, Bond DR, Jennings E, Russell JB. Alternative schemes of butyrate production in *Butyrivibrio fibrisolvens* and their relationship to acetate utilization, lactate production, and phylogeny. *Archives of Microbiology*, 1999, 171 (5) :324-330.
- [10] Duncan SH, Barcenilla A, Stewart CS, Pryde SE, Flint HJ. Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA) : acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (10) :5186-5190.
- [11] Asanuma N, Kawato M, Ohkawara S, Hino T. Characterization and transcription of the genes encoding enzymes involved in butyrate production in *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Current Microbiology*, 2003, 47 (3) :203-207.
- [12] Asanuma N, Ishiwata M, Yoshii T, Kikuchi M, Nishina Y, Hino T. Characterization and transcription of the genes involved in butyrate production in *Butyrivibrio fibrisolvens* type I and II strains. *Current Microbiology*, 2005, 51 (2) :91-94.
- [13] Louis P, Duncan SH, McCrae SI, Millar J, Jackson MS, Flint HJ. Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (7) :2099-2106.
- [14] Louis P, Flint HJ. Development of a semiquantitative degenerate real-time pcr-based assay for estimation of numbers of butyryl-coenzyme A (CoA) CoA transferase genes in complex bacterial samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (6) :2009-2012.
- [15] Monot M, Boursaux-Eude C, Thibonnier M, Vallenet D, Moszer I, Medigue C, Martin-Verstraete I, Dupuy B. Reannotation of the genome sequence of *Clostridium difficile* strain 630. *Journal of Medical Microbiology*, 2011, 60 (8) :1193-1199.
- [16] Louis P, Young P, Holtrop G, Flint HJ. Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA: acetate CoA-transferase gene. *Environmental Microbiology*, 2010, 12 (2) :304-314.
- [17] Hippe B, Zwieler J, Liszt K, Lassl C, Unger F, Haslberger AG. Quantification of butyryl CoA: acetate CoA-transferase genes reveals different butyrate production capacity in individuals according to diet and age. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 316 (2) :130-135.
- [18] Vermeiren J, Van den Abbeele P, Laukens D, Vigsnaes LK, De Vos M, Boon N, Van de Wiele T. Decreased colonization of fecal *Clostridium coccoides/Eubacterium rectale* species from ulcerative colitis patients in an in vitro dynamic gut model with mucin environment. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 79 (3) :685-696.
- [19] Paillard D, McKain N, Chaudhary LC, Walker ND, Pizette F, Koppova I, McEwan NR, Kopečný J, Vercoe PE, Louis P, Wallace RJ. Relation between phylogenetic position, lipid metabolism and butyrate production by different *Butyrivibrio*-like bacteria from the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2007, 91 (4) :417-422.
- [20] Eeckhaut V, Van Immerseel F, Croubels S, De Baere S, Haesebrouck F, Ducatelle R, Louis P, Vandamme P. Butyrate production in phylogenetically diverse Firmicutes isolated from the chicken caecum. *Microbial Biotechnology*, 2011, 4 (4) :503-512.
- [21] 刘威,朱伟文,姚文,毛胜勇.一株乳酸利用、丁酸产生菌的分离与鉴定及代谢特性的初步研究.微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2007, 47 (3) :435-440.
- [22] Hardham JM, King KW, Dreier K, Wong J, Strietzel C, Eversole RR, Sfintescu C, Evans RT. Transfer of *Bacteroides splanchnicus* to *Odoribacter* gen. nov. as *Odoribacter splanchnicus* comb. nov., and description of *Odoribacter denticanis* sp. nov., isolated from the crevicular spaces of canine periodontitis patients. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58 (1) :103-109.
- [23] Sakamoto M, Takagaki A, Matsumoto K, Kato Y, Goto K, Benno Y. *Butyricimonas synergistica* gen. nov., sp. nov. and *Butyricimonas virosa* sp. nov., butyric acid-producing bacteria in the family 'Porphyromonadaceae' isolated from rat faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59 (7) :1748-1753.

Genes and gene clusters involved in microbial butyrate-producing pathway of human and animal gastrointestinal tract

Jinting Li, Li Liu, Xin Dai*

The State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Human colon and animal digestive tract harbor large amount of butyrate-producing bacteria. The biosynthetic pathway of butyrate formation includes the central pathway from acetyl-CoA to butyryl-CoA and the last step converting butyryl-CoA to butyrate. The genes involved in the central pathway are clustered in genome but with different gene arrangements in different bacteria groups. The gene arrangements are coherent with their phylogenetic placements based on their 16S rRNA gene sequences. Recent researches have suggested that butyryl-CoA:acetate CoA-transferase play an important role in the last step of butyrate formation from butyryl-CoA and the genes are also widely found in bacterial strains producing butyrate. In this paper, combined with our own findings, we summarized advances in studying genes and gene clusters involved in butyrate formation.

Keywords: Gut/colon/rumen microbes, butyrate-producing, gene/gene cluster, butyryl-CoA:acetate CoA-transferase

(本文责编:张晓丽)

Supported by Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2011CB100804)

* Corresponding author. Tel: +86-10-64807418; Fax: +86-10-64807429; E-mail: daixin@im.ac.cn

Received: 10 April 2012 /Revised: 26 June 2012

1953年创刊以来所有文章全文上网

从2008年1月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>)浏览、查询、免费下载全文!由于《微生物学报》历史久远,为方便读者查阅,将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、期统计表

2012年10月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 - 1956	半年刊	1 - 4	1 - 2
1957 - 1958	季刊	5 - 6	1 - 4
1959	季刊	7	1 - 2
1959 - 1962	停刊3年		
1962	季刊	8	3 - 4
1963 - 1965	季刊	9 - 11	1 - 4
1966	季刊	12	1 - 2
1966 - 1972	停刊6年半		
1973 - 1988	季刊	13 - 28	1 - 4
1989 - 2007	双月刊	29 - 47	1 - 6
2008 - 2011	月刊	48 - 51	1 - 12
2012	月刊	52	10