

分枝杆菌枝菌酸合成及其调控

罗红丽², 庞蕾², 谢建平^{1*}

¹西南大学生命科学学院, 三峡库区生态环境与生物资源省部共建国家重点实验室培育基地, 现代生物医药研究所, 重庆 400715

²西南大学药学院, 重庆 400716

摘要:结核病是危害人类健康的重要传染病, 每年 200 多万人死于结核病。耐(多)药菌株的出现、与 HIV 共感染以及人口老龄化等原因与全球结核病的卷土重来密切相关。枝菌酸是存在于结核分枝杆菌、其他分枝杆菌和许多放线菌的细胞壁中的关键组分, 与结核分枝杆菌的致病、毒力和免疫逃避都有关系。枝菌酸在抗结核研究中有着极其重要的地位。结核分枝杆菌枝菌酸的生物合成途径一直是很重要的抗结核药物靶标, 异烟肼、乙胺丁醇等抗结核药物都是以此为靶标。深入研究枝菌酸的合成、调控有助于发现更多的药物靶标, 为开发结核病控制新措施提供基础。本文综述了结核分枝杆菌枝菌酸的结构与分类、生物合成途径及其调控、作为抗结核药物靶标的前景与应用, 以期对枝菌酸有更深入的了解并为新型抗结核药物靶标的发现提供基础。

关键词: 结核分枝杆菌, 枝菌酸, 生物合成调控, 药物靶标

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 02-0146-06

结核病 (Tuberculosis, TB) 是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB, 简称结核菌) 感染导致的全世界最致命的疾病之一。每年全球约 800 万新发肺结核患者、200 多万人死于结核病, 约 1/3 人口感染过结核菌^[1]。随着耐多药菌株、HIV 共感染、结核病治疗新药匮乏、唯一可用的疫苗卡介苗的效果不稳定甚至致病性, 以及跨国流动加速等加剧了全球结核病控制的困境^[1-2]。深入研究结核菌生理代谢, 发现新药靶, 筛选新药, 是控制结核病的关键和迫切需求。

枝菌酸 (Mycolic acid, mycolate) 最先由 Stodola 等 1938 年在结核菌中发现^[3], 但广泛存在于放线菌

中。它是结核菌细胞壁的重要组成部分, 对稳定胞壁结构、维持其致密性、以及耐受抗生素都起着关键作用。结核菌枝菌酸的独特之处是长度和特殊结构。此外, 枝菌酸还与结核菌的生长、存活、毒力和耐药性密切相关。因此, 结核菌可以通过调整枝菌酸的合成量来适应不断变化的外界环境^[4]。枝菌酸合成途径是结核病一线治疗药物的靶标, 也被认为是发现新结核病药物靶标的富矿区。为此, 结合我们课题组对结核菌枝菌酸合成转录调控的研究, 本文总结了枝菌酸的结构、分类、生物合成途径、合成调控以及药物作用靶标进展, 为新药物靶标研究提供基础。

基金项目: 国家重要传染病科技重大专项 (2012ZX10003-003); 国家自然科学基金 (81071316)

* 通信作者。Tel: +86-23-68367108; E-mail: georgex@swu.edu.cn

作者简介: 罗红丽 (1975-), 女, 重庆北碚人, 实验师, 主要从事放线菌研究。E-mail: hongli75@swu.edu.cn

收稿日期: 2011-09-27; 修回日期: 2011-11-07

1 枝菌酸的结构和分类

枝菌酸是带有 α -烷基侧链的 β -羟基长链高分子疏水脂肪酸^[5]。枝菌酸的羧基与阿拉伯半乳糖的羟基通过酯键垂直相连,阿拉伯半乳糖再通过磷脂键与肽聚糖层连接,其他糖脂和游离脂类则规则地分布在枝菌酸中^[6],形成厚且致密、渗透性差的细胞壁结构,所以不仅能够使结核菌抵御干燥环境和外来有害化学物质的侵害,还可以使其在巨噬细

胞中进行繁殖^[7]。所有诺卡氏菌型的菌株都含有枝菌酸,棒状杆菌(*Corynebacterium*)碳链长度为 $C_{20} - C_{38}$;诺卡氏菌(*Nocardia*)为 $C_{40} - C_{60}$,分枝杆菌(*Mycobacterium*)为 $C_{70} - C_{90}$ 。通过碳链长度可以区分不同属的菌株。根据碳链是否被氧化及其氧化程度,分枝杆菌中的枝菌酸可以分为3种类型即: α -枝菌酸(α -mycolic acid)、甲氧基枝菌酸(methoxy-mycolic acid)和酮基枝菌酸(keto-mycolic acid)^[1],结构如图1。

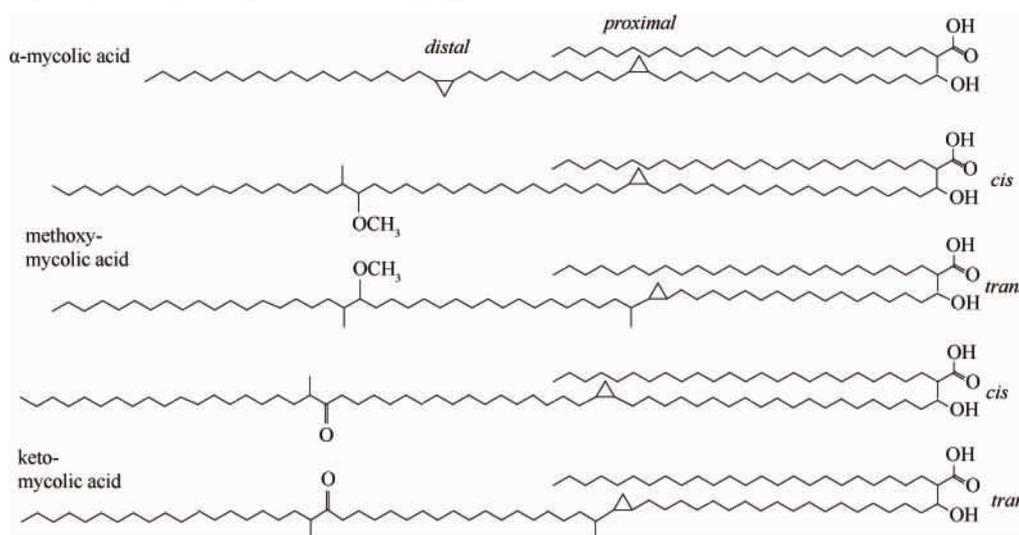


图1 结核菌中枝菌酸的分子结构

Fig. 1 Molecular structures of mycolic acids. There are three types of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*, illustrated with α -mycolic acid, methoxy-mycolic acid and keto-mycolic acid.

在3种不同的枝菌酸中, α -枝菌酸含量超过70%,是一种含有顺式双环丙烷环结构的脂肪酸。甲氧基和酮基类型的枝菌酸含量均为10% - 15%,在羧基远端分别含有甲氧基和酮基,具有顺、反式两种构象^[1]。环丙基、甲氧基和酮基官能团对于结核菌的毒力非常重要。环丙基可以提高结核菌对外界氧化的耐受力。如果去除 α -枝菌酸的环丙烷环,结核菌的生长明显被抑制。甲氧基和酮基可以改变细胞壁的渗透性,如果去除,结核菌在巨噬细胞中的生长受到严格限制,其毒力也随之下降^[8]。由此可见,枝菌酸碳链上的基团发生改变,可能影响结核菌的生长,引起致病力的改变。

2 枝菌酸的生物合成途径^[1]

枝菌酸是由 C_{56-64} 不完全分枝酰基链和 C_{24-26}

脂肪酰基链缩合而成,在其合成途径中存在两种类型的脂肪酸合成酶即:与真核或高等原核生物相似的多功能脂肪酸合成酶(FAS-I)和与植物或细菌相似的包含一系列单一功能酶的脂肪酸合成酶(FAS-II)。

在整个合成途径中,FAS-I系统主要负责合成FAS-II系统所需的底物 C_{20} -S-CoA 和 claisen-type 缩合反应需要的前体 C_{26} -S-CoA。FAS-II系统分为FAS-II A、FAS-II 和 FAS-II B 三个单元,主要负责延长碳链。在结核菌细胞内,枝菌酸的合成大致分为以下四个步骤。第一步:乙酰辅酶A和丙二酰辅酶A为底物,以2个碳原子为单位,在FAS-I作用下延长碳链,最终生成 C_{20} -S-CoA 和 C_{26} -S-CoA,分别为FAS-II系统的底物和 α -烷基侧链的来源。第二步:以 C_{20} -S-CoA 和丙二酰-S-CoA 作为起始化合物,通过 ACP 转酰酶(FabD)、 β -ketoacyl-ACP 合成酶III

(FabH)、 β -ketoacyl-ACP 还原酶 (MabA)、 β -hydroxyacyl-ACP 脱水酶 (HadABC)、2-*trans*-enoyl-ACP 异构酶 (EchA10/11) 将碳链从 C_{20} 延长至 C_{22} (即 FAS-II A); 在 FabD、 β -ketoacyl-ACP 合成酶 (KasA)、MabA、 β -hydroxyacyl-ACP 脱水酶 (HadABC) 和 2-*trans*-enoyl-ACP 还原酶 (InhA) 作用下经过 5 次循环, 将碳链延长至 C_{32} (即 FAS-II); 在 FabD、KasA/B、MabA、 β -hydroxyacyl-ACP 脱水酶 (HadABC) 和 EchA10/11 作用下将碳链延长至 C_{34} (FAS-II B); 再次进入 FAS-II (此过程 KasB 取代 KasA) 将碳链延长至 C_{50} ; 在环丙烷合成酶 (MmaA2 和 PcaA) 介导下, 生成 α -meroacyl-S-ACP。第三步: 以 α -meroacyl-S-ACP 为底物, 在甲基转移酶 MmaA4、MmaA1、MmaA3、MmaA2 和 CmaA2 以及 MmaA4、MmaA1、MmaA2、CmaA2 和 Redox 的作用

下经过氧化, 分别生成顺、反式构象的 methoxy-meroacyl-S-ACP 和 keto-meroacyl-S-ACP。第四步: 枝菌酸的装配。此步骤主要涉及 3 个反应: 在 Fad32 (fatty acyl-AMP 连接酶) 催化下, 将 α -methoxy-和 keto-meroacyl-S-ACP 转化生成相应的 meroacyl-AMP; 以 C_{26} -S-CoA (来源于 FAS-I) 为底物, 在 AccD4 和 AccD5 (acyl-CoA 羧化酶) 作用下, 生成 2-carboxyl- C_{26} -S-CoA; meroacyl-AMP 和 2-carboxyl- C_{26} -S-CoA 在 Pks13 (聚酮合酶 13) 催化下, 缩合生成枝菌酸。枝菌酸合成途径如图 2 所示。Pks13 是一种复合酶, 包括 5 个功能域: PPB (N/C-terminal phosphopantetheine-binding)、KS (ketoacyl-synthase)、AT (acyltransferase) 和 TE (thioesterase)。两个底物在 5 个功能域之间进行转移和基团缩合, 生成枝菌酸。合成途径涉及的酶及其编码基因见表 1。

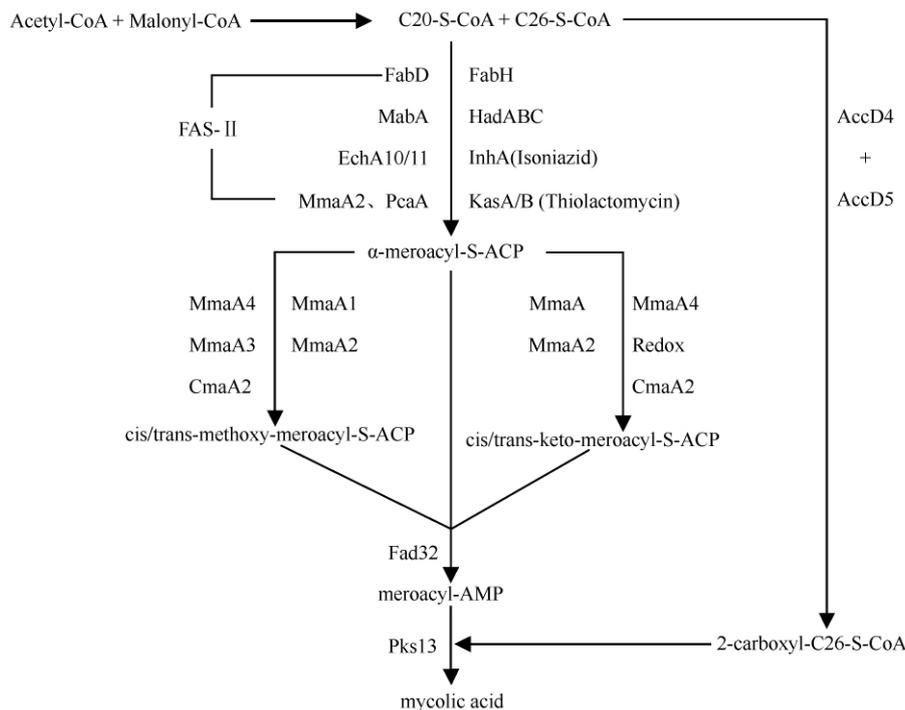


图 2 结核分枝杆菌枝菌酸生物合成途径及抗生素作用位点

Fig. 2 Biosynthesis pathway of *Mycobacterium tuberculosis* mycolic acid and well-characterized antibiotics targets.

3 枝菌酸合成的调控因子

目前对枝菌酸的结构、生物合成及生物学功能的研究较为详尽, 但对枝菌酸合成与环境的对应关系及其转录调控的研究则比较欠缺。迄今为止, 全球仅确定了两个转录因子以及磷酸化参与枝菌酸合

成的调控。我们正在证实另外一个参与枝菌酸合成调控的转录因子 Rv2989 的功能。我们前期的突变研究和可调控表达互补研究发现, 该转录因子正调控枝菌酸合成的关键操纵子 fabD, 并且在一定浓度范围内, 与细菌的拟核蛋白 lsr2 协同发挥调控功能 (未发表数据)。

表1 枝菌酸合成途径中的酶及其编码基因

Table 1 Enzymes and corresponding genes involved in the biosynthesis of *Mycobacterium tuberculosis* mycolic acid

System or step	Gene	Enzyme	Sanger identification
FAS-I	<i>Fas</i>	Fatty acid synthetase-I	<i>Rv2524c</i>
FAS-I to FAS-II	<i>FabD</i>	Malonyl-CoA: ACP transacylase	<i>Rv2243</i>
	<i>acpM</i>	Acyl carrier protein	<i>Rv2244</i>
	<i>fabH</i>	β -ketoacyl-ACP synthase III	<i>Rv0533c</i>
FAS-II	<i>KasA/B</i>	β -ketoacyl-ACP synthase	<i>Rv2245/2246</i>
	<i>MabA</i>	β -ketoacyl-ACP reductase	<i>Rv1483</i>
	<i>echA10/11</i>	2-trans-Enol-ACP isomerase	<i>Rv1142c/1141c</i>
	<i>inhA</i>	2-trans-Enol-ACP reductase	<i>Rv1484</i>
Methyltransferases	<i>mmaA1</i> , <i>mmaA2</i> ,	MmaA1, MmaA2,	<i>Rv0645c</i> , <i>Rv0644c</i> ,
	<i>mmaA3</i> , <i>mmaA4</i> ,	MmaA3, MmaA4,	<i>Rv0643c</i> , <i>Rv0642c</i> ,
	<i>cmaA2</i> , <i>pcaA</i>	CmaA2, PcaA	<i>Rv0503c</i> , <i>Rv0470c</i>
Claisen-type condensation	<i>accD4/5</i>	Acyl-CoA carboxylase	<i>Rv3799c/3280</i>
	<i>fadD32</i> , <i>pk13</i>	Fatty acyl-AMP ligase, Polyketide synthase-13	<i>Rv3801c/3800c</i>

结核菌全基因组具有与 FAS-II 系统相关的所有基因,其中大多分属于 2 个不同转录单元即: *fabD-acpM-kasA-kasB-accD6* 和 *mabA-inhA*^[9]。生物信息学分析发现,位于 *fabD* 操纵子上游的 *Rv2242* 可能编码转录调控因子 (MabR for Mycolic acid biosynthesis Regulator)。EMSA 和转录起始位点 (TSS) 分析证实了其转录调控因子的功能以及在维持细胞内的脂类平衡中的重要作用^[10]。

抗原 85 复合物 (Antigen 85 complex) 由 Ag85A、Ag85B、Ag85C 三个蛋白组成 (编码基因分别是 *fbpA*、*fbpB*、*fbpC*) ,负责将枝菌酸从一个海藻糖单枝菌酯转移到另一个海藻糖单枝菌酯,并将其转运到细胞壁阿拉伯半乳糖,形成海藻糖二枝菌酯 (TDM)。有研究表明, *Rv2327* (MabR 家族一员) 能够与 *fbpA*、*fbpC* 的启动子区结合,阻遏其表达,是 *fbpA*、*fbpC* 的转录抑制子,在含有芳香环的化合物出现的时候,该转录调控因子与芳香环化合物结合,上调 *fbpA*、*fbpC* 的表达^[11]。

除了以上两个调控子外,结核菌存在一种依赖于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (STPKs) 的调节机制。FAS-II 系统中的 *FabH*、*KasA* 和 *KasB* 是 STPKs 特异性的作用底物,它们可以通过 STPKs 被磷酸化,从而改变自身的酶活^[12]。2010 年, Romain 等人发现了一种新的 STPKs 特异性结合底物 *MabA*, 并且确定了它的磷酸化位点。通过基因诱导系统对磷酸化的 *MabA* 进行表达后,发现 *MabA* 磷酸化负调控枝菌酸的合成^[13]。

4 枝菌酸合成作为抗结核药物靶标

枝菌酸是结核菌难治的关键屏障之一^[14]。枝菌酸合成酶及其调控因子,是寻找治疗结核病新型药物靶标的关键。

结核菌的 FAS-II 系统涉及到的酶和基因比 FAS-I 系统多,一直以来,对于抗结核杆菌药靶的研究大多集中在 FAS-II 系统。有研究表明:如果 *InhA* 活性被抑制,整个 FAS-II 途径被完全阻断^[15,16]。吡啶-5-酰胺、4-芳基-substituted peperazines (哌嗪) 和吡啶衍生物对 *InhA* 有良好的抑制活性,化合物 Genz-8575 也被认为是一种具有良好潜力的抑制剂;化合物 17 是 KAS 的有效抑制剂。现在也发现了抑制枝菌酸加工过程中起重要作用的分枝酰转移酶的化合物^[17]。研究结核菌 11 种 STPKs 的磷酸化和调控机制发现:STPKs 可能是抗结核新化合物的潜在作用靶点^[18]。目前,针对 FAS-I 系统开展的药靶研究还很少, C_{26} -S-CoA 是枝菌酸合成的重要前体,阻断其合成也将影响枝菌酸的合成。因此, C_{26} -S-CoA 合成相关酶也可能作为药靶。另外,鉴于枝菌酸对于结核菌的极端重要性,其转录调控因子也必然不止上述几个。寻找更多的转录因子及其调控网络,将有助于发现更多新药物靶标,我们课题组已经采用转座子突变技术构建了分枝杆菌突变库,筛选其中的枝菌酸合成缺陷菌株,从中发现更多的枝菌酸合成的调控因子缺陷,以期作

为更好的结核菌药物靶标。

参考文献

- [1] Takayama K , Wang C , Besra GS. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Review* , 2005 , 18 (1) : 81-101.
- [2] 孙丕,梅建. 结核菌中的枝菌酸. 中国防痨杂志 (*Chinese Journal of Antituberculosis*) , 2010 , 32 (7) : 397-402.
- [3] Stodola FH , Lesuk A , Anderson RJ. The chemistry of the lipids of *tubercle bacilli*. LIV. The isolation and properties of mycolic acid. *The Journal of Biological Chemistry*. 1938 , 126 : 505-513.
- [4] Banerjee R , Vats P , Dahale S , Kasibhatla SM , Joshi R. Comparative genomics of cell envelope components in mycobacteria. *PLoS One* , 2011 , 6 (5) : e19280.
- [5] Asselineau J , Lederer E. Structure of the mycolic acids of mycobacteria. *Nature* , 1950 , 166 : 782-783.
- [6] Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: structure , biosynthesis and sites of drug action. *Current Opinion in Chemical Biology* , 1997 , 1 (4) : 579-588.
- [7] Daffe M , Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Advances in Microbial Physiology* , 1997 , 39 : 131-203.
- [8] Yuan Y , Lee RE , Besra GS , Belisle JT , Barry CE. Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* , 1995 , 92 (14) : 6630-6634.
- [9] Cole ST , Brosch R , Parkhill J , Garnier T , Churcher C , Harris D , Gordon SV , Eiglmeier K , Gas S , Barry CE , Tekaia F , Badcock K , Basham D , Brown D , Chillingworth T , Connor R , Davies R , Devlin K , Feltwell T , Gentles S , Hamlin N , Holroyd S , Hornsby T , Jagels K , Krogh A , Mclean J , Moule S , Murphy L , Oliver K , Osborne J , Quail MA , Rajandream MA , Rogers J , Rutter S , Seeger K , Skelton J , Squares R , Squares S , Sulston JE , Taylor K , Whitehead S , Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* , 1998 , 393 : 537-544.
- [10] Salzman V , Mondino S , Sala C , Cole ST , Gago G , Gramajo H. Transcriptional regulation of lipid homeostasis in mycobacteria. *Molecular Microbiology* , 2010 , 78 (1) : 64-77.
- [11] Romero IC , Mehaffy C , Burchmore RJ , Dobos-Elder K , Brennan P , Walker J. Identification of promoter-binding proteins of the *fbp A* and *C* genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* , 2010 , 90 (1) : 25-30.
- [12] Veyron-Churlet R , Molle V , Taylor RC , Brown AK , Besra GS , Zanella-Cleon I , Futterer K , Kremer L. The *Mycobacterium tuberculosis* β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III activity is inhibited by phosphorylation on a single threonine residue. *The Journal of Biological Chemistry* , 2009 , 284 (10) : 6414-6424.
- [13] Veyron-Churlet R , Zanella-Cleon I , Cohen-Gonsaud M , Molle V , Kremer L. Phosphorylation of the *Mycobacterium tuberculosis* β -ketoacyl-acyl carrier protein reductase MabA regulates mycolic acid biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* , 2010 , 285 (17) : 12714-12725.
- [14] Gao LY , Laval F , Lawson EH , Groger RK , Woodruff A , Morisaki JH , Cox JS , Daffe M , Brown EJ. Requirement for *kasB* in *Mycobacterium* mycolic acid biosynthesis , cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy. *Molecular Microbiology* , 2003 , 49 (6) : 1547-1563.
- [15] Vilcheze C , Moribidoni HR , Weisbrod TR , Iwamoto H , Kuo M , Sacchetti JC , Jacobs WR. Inactivation of the *inhA*-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASII end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology* , 2000 , 182 (14) : 4059-4067.
- [16] Marrakchi H , Laneelle G , Quemard A. *InhA* , a target of the antituberculous drug isoniazid , is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system , FAS-II. *Microbiology* , 2000 , 146 (2) : 289-296.
- [17] Ballell L , Field RA , Duncan K , Young RJ. New small-molecule synthetic antimycobacterials. *Antimicrobial agents and chemotherapy* , 2005 , 49 (6) : 2153-2163.
- [18] Wehenkel A , Bellinzoni M , Grana M , Duran R , Villarino A , Fernandez P , Andre-Leroux G , England P , Takiff H , Cervenansky C , Cole ST , Alzari PM. Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: Physiological roles and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta* , 2008 , 1784 (1) : 193-202.

Biosynthesis and regulation of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*—A review

Hongli Luo², Lei Pang², Jianping Xie^{1*}

¹ Institute of Modern Biopharmaceuticals, State Key Laboratory Breeding Base of Eco-Environment and Bio-Resource of the Three Gorges Area, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

² College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: Tuberculosis (TB) is one of the world's deadliest diseases. Approximately eight million individuals develop active tuberculosis annually, and two million die of tuberculosis. The emergence of multi-drug resistance strains, HIV co-infection, and an increasing aging population further worsen this scenario. Mycolic acids (MAs, also mycolate) are integral cell wall components of *Mycobacterium tuberculosis*, other mycobacterium and most actinomycetes, engaging in the remarkable survival ability of *Mycobacterium tuberculosis* within infected hosts, virulence and evasion of immunity. The biosynthesis and regulation of mycolic acids are rife with anti-tuberculosis drug targets. First-line tuberculosis drugs such as isoniazid and ethambutol target this pathway. In-depth investigation of this aspect will provide more opportunities to find better measures to combat tuberculosis. To this end, we reviewed the structures, classification, biosynthesis pathway, regulation factors in pathway of mycolic acid, as well as promising drug targets.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, mycolic acids, biosynthesis regulation, drug targets

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Megprojects for Key Infectious Disease (2012ZX10003-003) and by the National Natural Science Foundation of China (81071316).

* Corresponding author. Tel: +86-23-68367108; E-mail: georgex@swu.edu.cn

Received: 27 September 2011/Revise: 7 November 2011

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/actamicron>) 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 2 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	2