



游动放线菌 *Actinoplanes* sp. SE50/110 中阿卡波糖脱氧氨基糖单元的生物合成

张丹, 赵芹芹, 蒋明, 康前进, 白林泉*

上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

摘要:【目的】解析 *Actinoplanes* sp. SE50/110 (简称 SE50/110) 中阿卡波糖脱氧氨基糖单元的生物合成机制。【方法】经过 BLASTp 分析, 推测了 *AcbA*、*AcbB* 和 *AcbV* 负责阿卡波糖脱氧氨基糖单元的生物合成。首先, 本研究在 SE50/110 中分别构建了 *acbA*、*acbB* 和 *acbV* 的同框缺失和回补突变株。然后, 利用大肠杆菌 BL21(DE3)/pGro7 分别对 *AcbA*、*AcbB* 和 *AcbV* 成功实现了可溶性表达。最后, 以 D-葡萄糖-1-磷酸为起始底物, 通过体外催化反应, 研究脱氧氨基糖单元的生物合成过程和相关蛋白的酶学性质。【结果】在 SE50/110 中分别缺失 *acbA*、*acbB* 和 *acbV* 基因后, 相应突变株均丧失了阿卡波糖的合成能力, 将 *acbA*、*acbB* 和 *acbV* 基因分别回补后, 各菌株又恢复了阿卡波糖的合成能力, 证明了它们均为阿卡波糖生物合成的必需基因。在体外酶促反应中, D-葡萄糖-1-磷酸-胸腺嘧啶转移酶 *AcbA* 催化 D-葡萄糖-1-磷酸和 dTTP 合成 dTDP-D-葡萄糖, 对 D-葡萄糖-1-磷酸的 K_m 值为 (0.185 ± 0.053) mmol/L, V_{max} 为 (2.366 ± 0.217) $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$; 对 dTTP 的 K_m 值为 (4.964 ± 1.089) mmol/L, V_{max} 为 (60.310 ± 5.419) $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。dTDP-D-葡萄糖-4,6-脱水酶 *AcbB* 催化 dTDP-D-葡萄糖转化为 dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖, K_m 值和 V_{max} 分别为 (0.353 ± 0.089) mmol/L 和 (306.401 ± 28.740) $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。氨基转移酶 *AcbV* 催化 dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖生成 dTDP-4-氨基-4,6-双脱氧-D-葡萄糖, K_m 值和 V_{max} 分别为 (1.411 ± 0.293) mmol/L 和 (3.447 ± 0.279) $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。【结论】本研究阐明了阿卡波糖脱氧氨基糖单元的生物合成过程, 为全面解析阿卡波糖生物合成途径奠定了基础。同时, 测定了相关酶的动力学参数, 为代谢工程改造 SE50/110, 提高阿卡波糖产量提供了重要的理论依据。

关键词: 阿卡波糖, 脱氧氨基糖, 生物合成, 酶促反应

基金项目: 国家自然科学基金(31830104)

*通信作者。Tel/Fax: +86-21-34206722; E-mail: bailq@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2019-03-18; 修回日期: 2019-04-13; 网络出版日期: 2019-07-11

阿卡波糖(acarbose)作为 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 主要用于临床治疗 2 型糖尿病^[1]。目前, 阿卡波糖主要通过游动放线菌(*Actinoplanes* spp.)发酵生产^[2]。近年来, 全球糖尿病患病率激增, 截止 2017 年, 患病人数已高达 4.51 亿, 预计 2045 年将超过 6.93 亿^[3], 其中, 2 型糖尿病约占所有成人病例的 90%^[4]。阿卡波糖作为重要的口服降糖药物, 市场需求量不断增加。因此, 如何提高阿卡波糖产生菌的生产能力与产品的质量是亟待解决的重要问题。

阿卡波糖的化学结构(图 1-A)分别由一分子的 C₇-环醇(C₇-cyclitol)、脱氧氨基糖(deoxyaminosugar)和麦芽糖(maltose)组成^[5]。其生物合成基因簇(*acb* cluster)(图 1-B)全长约 30 kb, 包括 22 个结构基因, 负责该化合物的生物合成(*acbAB* 和 *acbVUSRPIJQKLMNOC*)、转运(*acbWXY*)及相关衍生物的形成(*acbDEZ*)。研究者们通过蛋白序列同源性比对、同位素标记喂养及酶催化反应等分析手段, 揭示了 C₇-环醇单元的合成是以 7-

磷酸-景天庚酮糖为前体, 经 *AcbC* 催化生成 2-表-5-表-有效醇酮, 再由 *AcbM* 和 *AcbO* 依次催化生成 7-磷酸-5-表-有效醇酮。在此基础上, 提出了阿卡波糖的生物合成是 C₇-环醇单元与脱氧氨基糖单元经糖基转移酶催化缩合, 再与一分子麦芽糖缩合, 最后被去磷酸化生成阿卡波糖^[6-7]。但除了 C₇-环醇单元合成中负责前三步催化反应的蛋白功能被解析以外, 其他的催化步骤均未得到证实。经过不断努力, 已经成功建立了高效的游动放线菌遗传操作体系^[8-11], 为鉴定阿卡波糖的生物合成基因、解析其生物合成途径奠定了良好的基础。这些方面的研究也为通过代谢工程创制优产的工业菌株、提高阿卡波糖产量与品质提供了重要依据。

结构多样的脱氧糖单元广泛存在于糖脂和糖蛋白的寡糖模块及众多次级代谢产物中, 并与重要的生物学活性有关。一般来说, 这些寡糖或次级代谢产物结构中的糖基是由核苷酸活化的脱氧糖经过糖基转移酶的催化而加载上的。其中, dTDP-脱氧糖普遍以 D-葡萄糖-1-磷酸为前体, 经

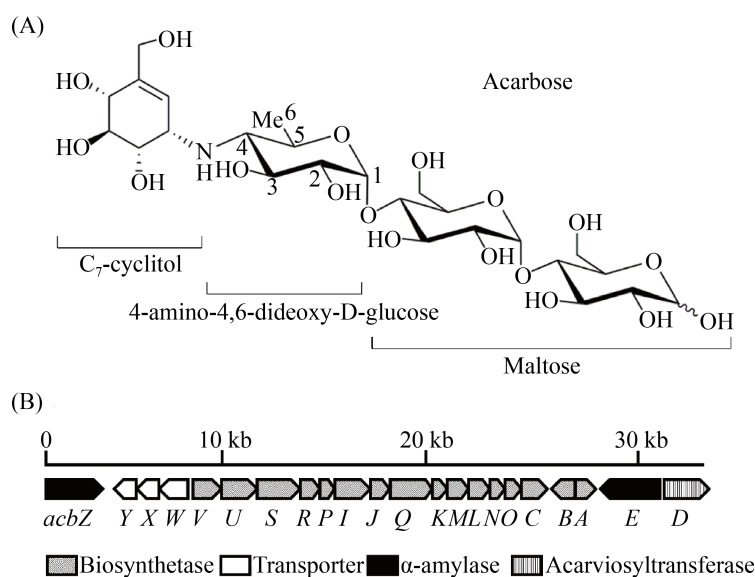


图 1. 阿卡波糖的化学结构式及生物合成基因簇

Figure 1. The chemical structure and biosynthetic gene cluster of acarbose.

D-葡萄糖-1-磷酸-胸腺嘧啶转移酶和 dTDP-D-葡萄糖-4,6-脱水酶的催化生成中间体 dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖^[12], 然后, 再经差向异构、转氨等多种修饰反应合成多样化的糖基结构单元, 参与各种天然产物的合成, 例如: 广泛存在于植物和微生物中的 dTDP-鼠李糖^[13-15]、*Shigella dysenteriae* 中的 O-抗原^[16]、*Streptomyces* GERI-155 中的 GERI-155^[17-19]、*S. argillaceus* 中的光神霉素^[20]以及 *S. violaceoruber* Tü22 中的榴菌素^[21]。这些研究作为解析阿卡波糖脱氧糖单元的生物合成途径提供了借鉴。

鉴定与解析脱氧氨基糖生物合成中相关基因的功能是解析阿卡波糖生物合成机制的重要组成部分。因此, 本研究在详细比对分析基因功能的基础上推测了 *acbA*、*acbB* 和 *acbV* 参与脱氧氨基糖单元的生物合成过程。然后, 通过体内基因敲除与回

补, 确定了这些基因为阿卡波糖生物合成的必需基因。最后, 通过体外催化反应, 揭示了脱氧氨基糖单元的生物合成过程, 并分别表征了相关酶的特性, 为解析阿卡波糖生物合成途径和代谢工程改造奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒、引物

试验中所用菌株、质粒和引物见表 1。

1.2 培养基和培养方法

大肠杆菌培养基包括 LB 液体和固体培养基; 游动放线菌培养基包括黄豆饼粉浸汁琼脂(SFM)培养基、STY 培养基、SM 培养基、TSB 培养基和阿卡波糖发酵培养基。大肠杆菌和游动放线菌的培养基配制方法和培养方法均参照文献[11]。

表 1. 实验中所用菌株、质粒和引物

Table 1. Strains, plasmids and primers used in this study

Strains/plasmids/primers	Related characters or sequences	Sources or references
<i>Actinoplanes</i> spp.		
SE50/110	Acarbose producer	ATCC
ZD03	<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Δ <i>acbA</i>	This work
ZD04	<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Δ <i>acbB</i>	This work
ZD05	<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Δ <i>acbV</i>	This work
ZD03:: <i>acbA</i>	<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Δ <i>acbA</i> :: <i>acbA</i>	This work
ZD04:: <i>acbB</i>	<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Δ <i>acbB</i> :: <i>acbB</i>	This work
ZD05:: <i>acbV</i>	<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Δ <i>acbV</i> :: <i>acbV</i>	This work
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B	Cloning host	GIBCO-BRL
ET12567(pUZ8002)	<i>recE</i> , <i>dam</i> ⁻ , <i>dcm</i> ⁻ , <i>hdsS</i> , <i>Cm</i> ^r , <i>Str</i> ^r , <i>Tet</i> ^r , <i>Km</i> ^r	[22]
BL21(DE3)/pGro7	Protein expression host	Sangon Biotech
Plasmids		
pLQ752	pJTU1278-derived vector with the <i>tsr</i> gene replaced by <i>aac(3)IV</i> and inserted <i>codA</i> gene	[11]
pDR4-K*	<i>aac(3)IV</i> , <i>xylE-neo</i> , <i>kasOp</i> *	[23]
pSET152	<i>oriT^{RK2}</i> , <i>aac(3)IV</i> , \emptyset 31 <i>int</i> , <i>attP</i>	[24]
pET30a	<i>ori^{pBR322}</i> , <i>Km</i> ^r , <i>lacI</i> , His-tag and S-tag coding genes	Novagen
pLQ1103	pLQ752-based plasmid for <i>acbA</i> inactivation	This work
pLQ1104	pLQ752-based plasmid for <i>acbB</i> inactivation	This work
pLQ1105	pLQ752-based plasmid for <i>acbV</i> inactivation	This work
pLQ1106	pSET152-based plasmid for overexpression of <i>acbA</i>	This work

(待续)

(续表 1)

pLQ1107	pSET152-based plasmid for overexpression of <i>acbB</i>	This work
pLQ1108	pSET152-based plasmid for overexpression of <i>acbV</i>	This work
pLQ1109	pET30a-based plasmid for <i>AcbA</i> expression	This work
pLQ1110	pET30a-based plasmid for <i>AcbB</i> expression	This work
pLQ1111	pET30a-based plasmid for <i>AcbV</i> expression	This work
Primers	Sequences (5'→3')	
<i>acbA</i> -L-F (<i>Xba</i> I)	GCTCTAGACGGATCTTCGCGGTGATGAC	
<i>acbA</i> -L-R (<i>EcoR</i> I)	CAGAATTCCTCGGTCTCGGTCTGATGA	
<i>acbA</i> -R-F (<i>EcoR</i> I)	CAGAATTCGACAGTACCTGCTGGCTCTG	
<i>acbA</i> -R-R (<i>Hind</i> III)	GCAAGCTTCACCTTCGACACCTACACCC	
<i>acbA</i> -C-F	GACGACCGTAACCTGCGTCA	
<i>acbA</i> -C-R	CACCGGAACTGTGGCAGTAC	
<i>acbB</i> -L-F (<i>Xba</i> I)	GCTCTAGACGGCGAAACTCGATCTGACC	
<i>acbB</i> -L-R (<i>EcoR</i> I)	CAGAATTCGTGTGGCAATGTCGCCACTG	
<i>acbB</i> -R-F (<i>EcoR</i> I)	CAGAATTCGAAACGGTCGCGTGGTATCG	
<i>acbB</i> -R-R (<i>Hind</i> III)	GCAAGCTTCTGCTGGACACCTTCAACCC	
<i>acbB</i> -C-F	CGTGATGACCAGGATCTCCC	
<i>acbB</i> -C-R	CGGATCTTCGCGGTGATGAC	
<i>acbV</i> -L-F (<i>Xba</i> I)	GCTCTAGAAGGATGCGGAACGAGTCGAG	
<i>acbV</i> -L-R (<i>EcoR</i> I)	CAGAATTCGAAAGTCGTGGACGTTCCAC	
<i>acbV</i> -R-F (<i>EcoR</i> I)	CAGAATTCGTTTCGTCATCGACGAGACC	
<i>acbV</i> -R-R (<i>Hind</i> III)	GCAAGCTTGTCTGGAGGACGTGTCTGAAG	
<i>acbV</i> -C-F	CAGGAGTGACCCGTGATGTG	
<i>acbV</i> -C-R	GAAGACGATCAGATGGCCGG	
<i>kasOp</i> *-F (<i>Xba</i> I)	GCTCTAGATGTTTCACATTCGAAACGGTCTCTGCT	
<i>kasOp</i> *-A-R	ACCGGCATGACGTCACCTCTTCAAC	
<i>acbA</i> -F	GTGACGTCATGCCGGTCTATGACAAACCGATGA	
<i>acbA</i> -R (<i>Bam</i> H I)	CTGGATCCTCACCCGGCGGCGGTCGAAGGCC	
<i>kasOp</i> *-B-R	ATTTTCATGACGTCACCTCTTCAAC	
<i>acbB</i> -F	GTGACGTCATGAAAATCTTGGTCACCGGCGGAG	
<i>acbB</i> -R (<i>Bam</i> H I)	CTGGATCCTCAGGTCCACCAGGAACGGTTGGCG	
<i>kasOp</i> *-V-R	CTGCTCACGACGTCACCTCTTCAAC	
<i>acbV</i> -F	GTGACGTCGTGAGCAGGCAGGCCGACCTGCTCG	
<i>acbV</i> -R (<i>Bam</i> H I)	CTGGATCCTCATGCCGTCACCCGCCCGCCTCG	
<i>AcbA</i> -EXP-F (<i>EcoR</i> I)	GAGAATTCATGCCGGTCTATGACAAACCGATG	
<i>AcbA</i> -EXP-R (<i>Hind</i> III)	GCAAGCTTTCACCCGGCGGCGGCGGTCA	
<i>AcbB</i> -EXP-F (<i>EcoR</i> I)	GAGAATTCATGAAAATCTTGGTCACCGG	
<i>AcbB</i> -EXP-R (<i>Hind</i> III)	GCAAGCTTTCAGGTCCACCAGGAACGGT	
<i>AcbV</i> -EXP-F (<i>EcoR</i> I)	GAGAATTCGTGAGCAGGCAGGCCGACCT	
<i>AcbV</i> -EXP-R (<i>Hind</i> III)	GCAAGCTTTCATGCCGTCACCCGCCCGG	

1.3 工具酶及试剂

实验中所用的高保真 DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶均购自大连宝生物工程有限公司; 小量质粒 DNA 抽提试剂盒、细菌 DNA 基因组提取试剂盒均购自上海捷瑞生物工程有限公司; 各种限制性内切酶购自 Thermo Scientific 公司; 胶回收试剂

盒购自 Omega 公司; 焦磷酸酶购自 Sigma 公司; 各种抗生素、dTTP、D-葡萄糖-1-磷酸、NAD⁺和 PLP 等试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 培养基相关试剂均购自上海国药集团化学试剂有限公司; 所用引物由上海擎科生物科技有限公司合成; dTDP-D-葡萄糖和 dTDP-4-酮基-6-脱

氧-D-葡萄糖标品购自卡博森斯化学科技(苏州)有限公司。

1.4 *Actinoplanes* sp.基因缺失的方法

为构建 *acbA* 基因缺失的突变株, 首先以 SE50/110 基因组 DNA 为模板, 分别以携带 *Xba* I/*EcoR* I 酶切位点的 *acbA*-L-F/R 和携带 *EcoR* I/*Hind* III 酶切位点的 *acbA*-R-F/R 为引物, 利用 PCR 扩增得到 1.52 kb 和 1.62 kb 的上下游同源片段, 将测序正确的片段经酶切、酶连插入游离型载体 pLQ752, 获得重组质粒 pLQ1103。将重组质粒转入大肠杆菌 ET12567(pUZ8002)中, 采用菌丝体接合转移的方式将质粒导入 SE50/110 中, 经松弛和筛选, 获得基因同框缺失菌株。抽提其基因组 DNA 作为模板, 以 *acbA*-C-F/R 为验证引物进行 PCR 扩增, 扩增得到 0.62 kb 的片段, 而以 SE50/110 基因组 DNA 为模板, 得到 1.32 kb 的片段, 则表明突变株构建成功, 命名为 ZD03。在构建 *acbB* 基因缺失的突变株时, 首先以 SE50/110 基因组 DNA 为模板, 分别以 *acbB*-L-F/R 和 *acbB*-R-F/R 为引物, 经 PCR 扩增得到 1.54 kb 和 1.62 kb 的上下游同源片段, 并将测序正确的片段插入载体 pLQ752 中, 获得重组质粒 pLQ1104。将质粒导入大肠杆菌 ET12567(pUZ8002)中, 经接合转移、松弛和筛选后, 以 *acbB*-C-F/R 为验证引物进行 PCR 验证, 若以重组菌株基因组 DNA 为模板, 扩增得到 0.63 kb 的片段, 而以 SE50/110 基因组 DNA 为模板, 得到 1.50 kb 的片段, 则表明成功构建了突变株, 命名为 ZD04。按照上述的方法构建用于 *acbV* 敲除的重组质粒 pLQ1105, 然后, 构建筛选得到相应的突变株, 以 *acbV*-C-F/R 为引物进行 PCR 验证, 若以突变株基因组 DNA 为模板, 扩增获得 0.69 kb 的片段, 而以 SE50/110 基因组 DNA

为模板获得 1.67 kb 的片段, 则表明突变株构建正确, 命名为 ZD05。

1.5 *Actinoplanes* sp.基因回补的方法

为构建 *acbA* 基因回补的突变株, 首先, 以 pDR4-K*质粒 DNA 为模板, 以 *kasOp**-F/*kasOp**-A-R 为引物, 通过 PCR 扩增得到 0.13 kb 的 *kasOp** 启动子片段; 以 SE50/110 基因组 DNA 为模板, 以 *acbA*-F/R 为引物扩增得到 0.85 kb 的 *acbA* 基因片段。再以 *kasOp**-F/*acbA*-R 为引物, 经重叠 PCR 扩增得到长为 0.98 kb 的 *kasOp**-*acbA* 片段。将测序正确的片段经酶切、酶连插入 pSET152 中, 获得整合型质粒 pLQ1106, 并转入大肠杆菌 ET12567(pUZ8002), 经接合转移将质粒导入 ZD03, 利用引物 *kasOp**-F/*acbA*-R 进行 PCR 验证。若以突变株 DNA 为模板获得长为 0.96 kb 的 PCR 片段, 而以 SE50/110 基因组 DNA 为模板无扩增条带, 则表明基因回补成功。按照同样的方法分别构建用于 *acbB* 和 *acbV* 回补的整合型质粒 pLQ1107 和 pLQ1108, 分别导入 ZD04 和 ZD05 中, 筛选获取相应的突变株, 分别以引物 *kasOp**-F/*acbB*-R 和 *kasOp**-F/*acbV*-R 进行 PCR 验证, 若分别扩增获得 1.09 kb 和 1.42 kb 的 PCR 产物, 则表明基因回补成功。

1.6 蛋白的表达菌株构建、表达及纯化

1.6.1 蛋白表达菌株的构建: 为获得 *AcbA* 蛋白表达质粒, 首先以 SE50/110 基因组 DNA 为模板, 以携带 *EcoR* I/*Hind* III 酶切位点的 *AcbA*-EXP-F/R 为引物, 利用 PCR 扩增得到 0.85 kb 的 *acbA* 基因片段。将测序正确的片段经酶切、酶连插入载体 pET30a, 获得质粒 pLQ1109。以同样的方法构建分别用于 *AcbB* 和 *AcbV* 蛋白表达的质粒 pLQ1110 和 pLQ1111。将上述质粒分别转化至大肠杆菌

BL21(DE3)/pGro7 中, 获得蛋白表达菌株。

1.6.2 蛋白表达: 将蛋白表达菌株接种于含 50 mg/L 卡那霉素和 25 mg/L 氯霉素的 LB 培养基中过夜培养, 而后转接至含有 0.5 mg/mL L-阿拉伯糖、50 mg/L 卡那霉素和 25 mg/L 氯霉素的 LB 培养基中, 在 37 °C、220 r/min 条件下培养至 OD_{600} 达到 0.6–0.8 时, 加入终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 在 16 °C 条件下继续培养 20–22 h。最后, 将菌液以 5000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 并放置于 -80 °C 保存待用。

1.6.3 蛋白纯化: 用含 25 mmol/L Tris-HCl、300 mmol/L NaCl 的 Buffer A (pH 8.0) 重悬菌体, 经超声破碎后, 在 4 °C 离心机中, 以 12000 r/min 离心 30 min, 将上清液上载至镍亲和层析柱上, 依次用 Buffer A 和 25 mmol/L 咪唑洗去杂蛋白, 再用 250 mmol/L 咪唑洗脱目标蛋白, 而后, 经 10 kDa 的 Millipore 超滤管脱盐浓缩后, 利用 SDS-PAGE 分析蛋白的纯化情况。

1.7 蛋白的体外功能分析及酶学性质表征

1.7.1 AcbA 蛋白功能鉴定: 在 20 μ L 反应体系中加入 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、24 mmol/L D-葡萄糖-1-磷酸、12 mmol/L dTTP、12 mmol/L $MgCl_2$ 、0.12 U 焦磷酸酶、20 μ mol/L AcbA 蛋白, 置于 30 °C 反应 12 h 后, 用 40 μ L 甲醇终止反应, 而后利用 LC-ESI-MS 检测产物的生成情况。

1.7.2 AcbB 蛋白功能鉴定: 在 20 μ L 反应体系中加入 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、5 mmol/L dTDP-D-葡萄糖、1 mmol/L NAD^+ 、20 μ mol/L AcbB 蛋白, 置于 30 °C 反应 1 h 后, 用 40 μ L 甲醇终止反应, 然后利用 LC-ESI-MS 检测产物的产生情况。

1.7.3 AcbV 蛋白功能鉴定: 在 20 μ L 反应体系中

加入 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、5 mmol/L dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖、1 mmol/L PLP、8 mmol/L L-谷氨酸、20 μ mol/L AcbV 蛋白, 置于 30 °C 反应 6 h 后, 用 40 μ L 甲醇终止反应, 再利用 LC-ESI-MS 检测产物的生成情况。

1.7.4 温度对酶活性的影响: 利用蛋白功能鉴定的反应体系, 分别置于 20、25、30、33、37、40、45 和 50 °C 进行反应, 每个条件进行了 3 次生物学重复。其中, AcbA、AcbB 和 AcbV 的反应时间分别为 8、1 和 6 h。终止反应后, 利用 HPLC-QQQMS 分别测定 AcbA 和 AcbB 反应后产物的生成量或 AcbV 反应后底物的消耗量, 计算反应速率, 确定酶的相对活性, 进而确定最适温度。

1.7.5 pH 对酶活性的影响: 在最适温度条件下, 分别利用 pH 5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 和 9.0 的缓冲体系进行反应, 每个条件进行 3 次生物学重复。其中 pH 5.0–7.0 采用 Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液, pH 7.5–9.0 采用 Tris-HCl 缓冲液, AcbA、AcbB 和 AcbV 的反应时间分别为 8、1 和 6 h。终止反应后, 利用 HPLC-QQQMS 分别测定 AcbA 和 AcbB 反应后产物的生成量及 AcbV 反应后底物的消耗量, 计算反应速率, 确定酶的相对活性, 进而确定最适 pH。

1.7.6 测定酶动力学参数: 为测定 AcbA 对底物 D-葡萄糖-1-磷酸的酶动力学参数, 在反应体系 (20 μ L) 中加入 50 mmol/L Tris-HCl (最适 pH)、12 mmol/L dTTP、12 mmol/L $MgCl_2$ 、0.12 U 焦磷酸酶、20 μ mol/L AcbA 蛋白以及 D-葡萄糖-1-磷酸 (浓度分别为 0.06、0.08、0.20、0.40、0.80、1.00 mmol/L), 在最适温度下反应 8 h 后, 用 40 μ L 甲醇终止反应, 随后, 利用 HPLC-QQQMS

测定产物 dTDP-D-葡萄糖的生成量来计算反应速率, 每个条件进行了 3 次生物学重复。最终, 利用软件 GraphPad Prism 5 绘制 Michaelis-Menten 拟合曲线并计算酶动力学参数。在测定 AcbA 对底物 dTTP 的酶动力学参数时, 体系中 D-葡萄糖-1-磷酸的含量为 24 mmol/L, 底物 dTTP 的浓度分别为 0.4、0.6、2.0、4.0、10.0 和 12.0 mmol/L, 其他参数保持不变, 通过测定 dTDP-D-葡萄糖生成量来计算反应速率, 进而计算酶动力学参数。为测定 AcbB 对底物 dTDP-D-葡萄糖的动力学参数, 在 20 μ L 反应体系中加入 50 mmol/L Tris-HCl (最适 pH)、1 mmol/L NAD⁺、20 μ mol/L AcbB 蛋白以及 dTDP-D-葡萄糖(浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L), 在最适温度下反应 1 h 后, 用 40 μ L 甲醇终止反应, 各条件分别有 3 次生物学重复。通过测定产物 dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖的生成量来计算反应速率, 进而拟合计算酶动力学参数。为测定 AcbV 对底物 dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖的酶动力学参数, 在 20 μ L 反应体系中加入 50 mmol/L Tris-HCl (最适 pH)、1 mmol/L PLP、8 mmol/L L-谷氨酸、20 μ mol/L AcbV 蛋白以及 dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖(浓度分别为 0.4、0.6、0.8、2.0 和 8.0 mmol/L), 在最适温度下反应 6 h 后, 用 40 μ L 甲醇终止反应, 每个条件有 3 次重复。通过检测底物 dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖的消耗量来计算反应速率, 并拟合计算酶动力学参数。

1.8 化合物的定性定量分析方法

1.8.1 发酵液中阿卡波糖的定量测定: 吸取 1 mL 的发酵液, 经 12000 r/min 离心后取上清液进行过滤, 再利用 HPLC (Agilent HPLC 1260) 进行检测。色谱条件: 色谱柱 Agilent phenomenex NH₂ 柱

(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 流动相: 65%乙腈-35%磷酸盐(0.6 g/L KH₂PO₄、0.35 g/L Na₂HPO₄·2H₂O); 检测波长: 210 nm, 流速: 1.0 mL/min, 进样体积: 10 μ L, 柱温: 25 $^{\circ}$ C。

1.8.2 脱氧氨基糖单元相关化合物的定性测定:

将终止后的反应混合物经 12000 r/min 离心 10 min, 上清液用 UPLC-TOFMS (Agilent UPLC 1290-MS 6230) 在负离子模式下检测。色谱条件: 色谱柱 Agilent ZORBAX SB-Aq 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 流动相: 0.5%甲醇-99.5%水; 检测波长: 254 nm; 流速: 0.4 mL/min; 进样体积: 10 μ L; 柱温: 25 $^{\circ}$ C。

1.8.3 脱氧氨基糖单元相关化合物的定量测定:

将终止后的反应混合物经 12000 r/min 离心 10 min, 上清液用 HPLC-QQQMS (Agilent HPLC 1260-QQQMS 6470) 检测。色谱条件与 UPLC-TOFMS 条件相同。dTDP-D-葡萄糖的母离子为 563.0685, 定量片段为 320.80, dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖的母离子为 545.0579, 定量片段为 321.40。

2 结果和分析

2.1 鉴定负责阿卡波糖脱氧氨基糖单元合成的必需基因

采用 BLASTp 对阿卡波糖生物合成基因簇所编码的蛋白进行功能预测, 发现 AcbA 蛋白与 *E. coli* 的 RfbA 和 *Pseudomonas aeruginosa* 的 RmlA 在氨基酸水平上分别具有 53.61% 和 55.00% 的一致性, 为 D-葡萄糖-1-磷酸胸腺嘧啶转移酶, 负责催化 D-葡萄糖-1-磷酸和 dTTP 生成 dTDP-D-葡萄糖; AcbB 蛋白分别与 *E. coli* 的 RfbB 和 *P. aeruginosa* 的 RmlB 有 45.11% 和 45.75% 的一致性, 为 dTDP-D-葡萄糖-4,6-脱水酶, 可催化 dTDP-D-葡萄

糖转化为 dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖; *AcbV* 蛋白与转氨酶有较高的一致性,其可能为 dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖转氨酶,催化 dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖生成 dTDP-4-氨基-4,6-双脱氧-D-葡萄糖。因此,推测编码这 3 个蛋白的基因可能参与阿卡波糖脱氧氨基糖单元的合成。

为了对编码上述蛋白的基因进行体内功能验证,利用 PCR 扩增,获得了 *acbA*、*acbB* 和 *acbV* 的上下游同源臂,分别构建了用于基因同框缺失的质粒 pLQ1103、pLQ1104 和 pLQ1105。然后,将质粒分别转化至大肠杆菌 ET12567(pUZ8002)中,再利用接合转移的方法分别将质粒导入至 SE50/110 中。获得接合子后,经松弛、筛选和 PCR 验证得到缺失目标基因的突变株。其中,SE50/110 Δ *acbA*、SE50/110 Δ *acbB* 和 SE50/110 Δ *acbV* 分别被命名为 ZD03、ZD04 和 ZD05 (图 2-A-C, i, ii)。将突变株进行发酵,利用 HPLC 分析相关突变株的发酵产物。结果显示,在 ZD03、ZD04 和 ZD05 的发酵液中均无阿卡波糖积累(图 2-D),该结果表明 *acbA*、*acbB* 和 *acbV* 编码的蛋白参与了阿卡波糖的生物合成过程。

为了进一步验证上述突变株丧失阿卡波糖合成能力的确是由基因缺失所导致,又分别将 *acbA*、*acbB* 和 *acbV* 经 PCR 扩增后,构建至强启动子 *kasOp** 的控制下,获得了分别携带基因盒 *kasOp*-acbA*、*kasOp*-acbB* 和 *kasOp*-acbV* 的整合型质粒 pLQ1106、pLQ1107 和 pLQ1108,利用接合转移的方法将基因分别回补至 ZD03、ZD04 和 ZD05,经 PCR 验证正确后,获得突变株 ZD03::*acbA*、ZD04::*acbB* 和 ZD05::*acbV*(图 2-A-C, iii)。而后,将获得的突变株进行摇瓶发酵,利用 HPLC 检测相应的发酵产物,结果显示(图 2-D),突变株均恢复了阿卡波糖的合成能力。该结果表

明, *acbA*、*acbB* 和 *acbV* 的确是阿卡波糖生物合成的必需基因。

2.2 *AcbA* 的功能分析及其酶学性质表征

2.2.1 *AcbA* 蛋白的表达及其功能分析: *AcbA* 蛋白属于 D-葡萄糖-1-磷酸胸腺嘧啶转移酶,催化脱氧氨基糖单元生物合成的第一步。为获得该蛋白并验证其功能,首先,按照 1.6 中所述的方法构建了表达质粒 pLQ1109,并将其导入至 BL21(DE3)/pGro7 中,经诱导表达、镍亲和层析柱纯化及 SDS-PAGE 分析,成功纯化得到了大小约为 36 kDa 的蛋白(图 3-A)。在蛋白表达过程中,由于没有引入分子伴侣,无可溶性目标蛋白表达,所以改用含有 pGro7 质粒的 BL21(DE3)蛋白表达宿主,但由于分子伴侣 GroES-GroEL 表达量较大,且非特异性吸附至亲和层析填料上,所以即使经过了数次纯化方法的优化,在目标蛋白溶液中仍然残余部分 GroES-GroEL 蛋白。因此,利用 GIS 1D 分析软件计算了 *AcbA* 的含量为 31.51%。

随后,参考 D-葡萄糖-1-磷酸胸腺嘧啶转移酶的反应条件^[17],按照 1.7.1 所述方法,以 D-葡萄糖-1-磷酸(Glc-1-P)和 dTTP 为底物,利用 Tris-HCl (pH 8.0)为缓冲液,以 Mg^{2+} 为辅因子,建立了 *AcbA* 的反应体系。在 30 °C 反应 12 h 后,利用 2 倍体积的甲醇终止反应。采用 LC-ESI-MS 分析,在 8.0 min 处出现了产物 dTDP-D-葡萄糖(dTDP-Glc)的分子离子峰($C_{16}H_{26}O_{16}N_2P_2$), $m/z=563.0664$ [$M-H$]⁻ (计算值 $m/z=563.0685$ [$M-H$]⁻),与 dTDP-Glc 标准品的出峰时间和 m/z 吻合。而在失活蛋白的对照反应组中,没有出现 dTDP-Glc 的信号(图 3-B)。该研究结果表明,*AcbA* 可催化 D-葡萄糖-1-磷酸和 dTTP 反应生成 dTDP-D-葡萄糖。

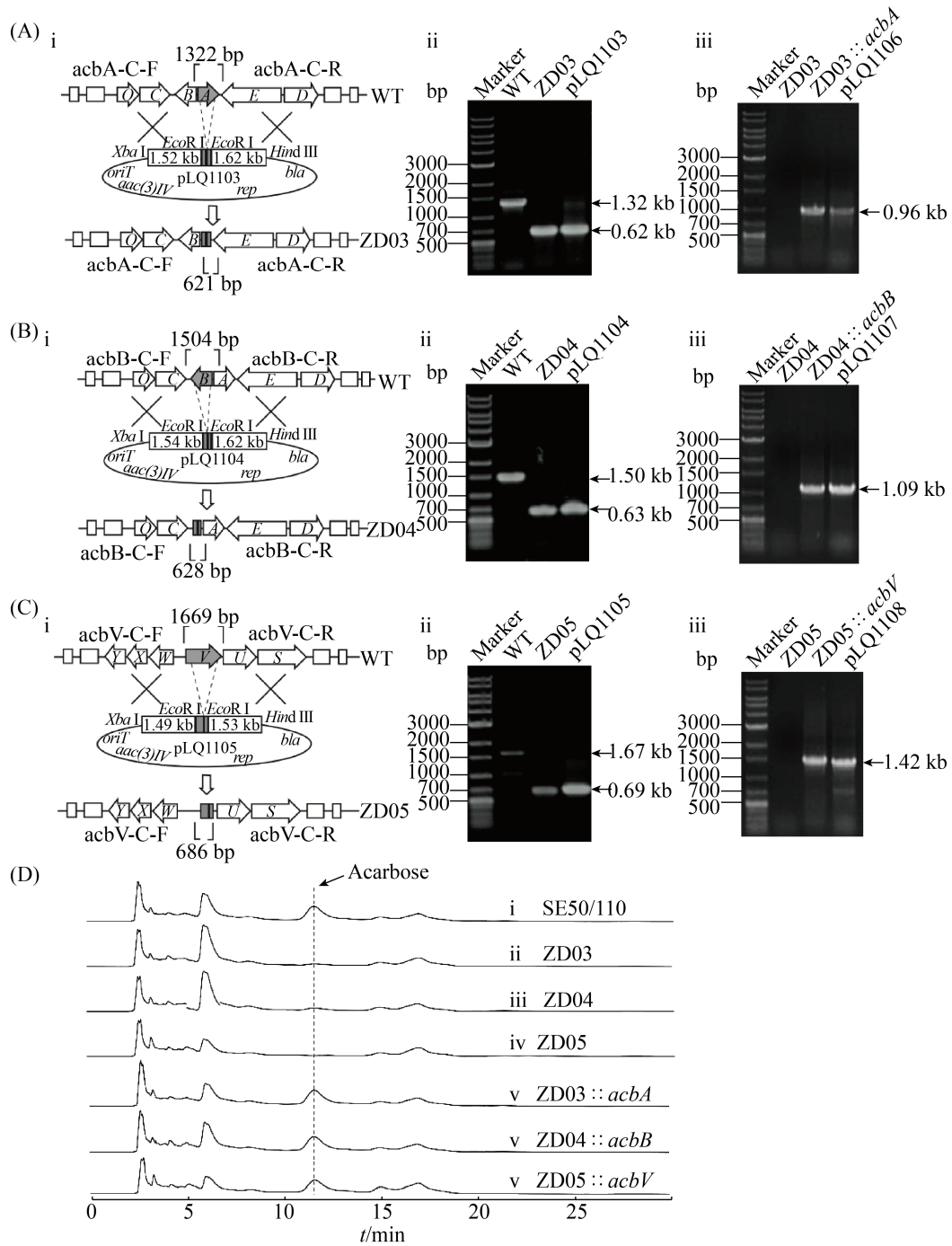


图 2. *acbA*、*acbB* 和 *acbV* 的基因缺失与回补及突变株产生阿卡波糖的情况

Figure 2. Deletion and trans-complementation of genes *acbA*, *acbB* and *acbV* and productions of acarbose by mutants. A: i: Schematic diagram of *acbA* deletion; ii: Verification of ZD03 by PCR amplification; iii: Verification of ZD03::*acbA* by PCR amplification. B: i: Schematic diagram of *acbB* deletion; ii: Verification of ZD04 by PCR amplification; iii: Verification of ZD04::*acbB* by PCR amplification. C: i: Schematic diagram of *acbV* deletion; ii: Verification of ZD05 by PCR amplification; iii: Verification of ZD05::*acbV* by PCR amplification. D: Fermentation product analysis of mutants by HPLC.

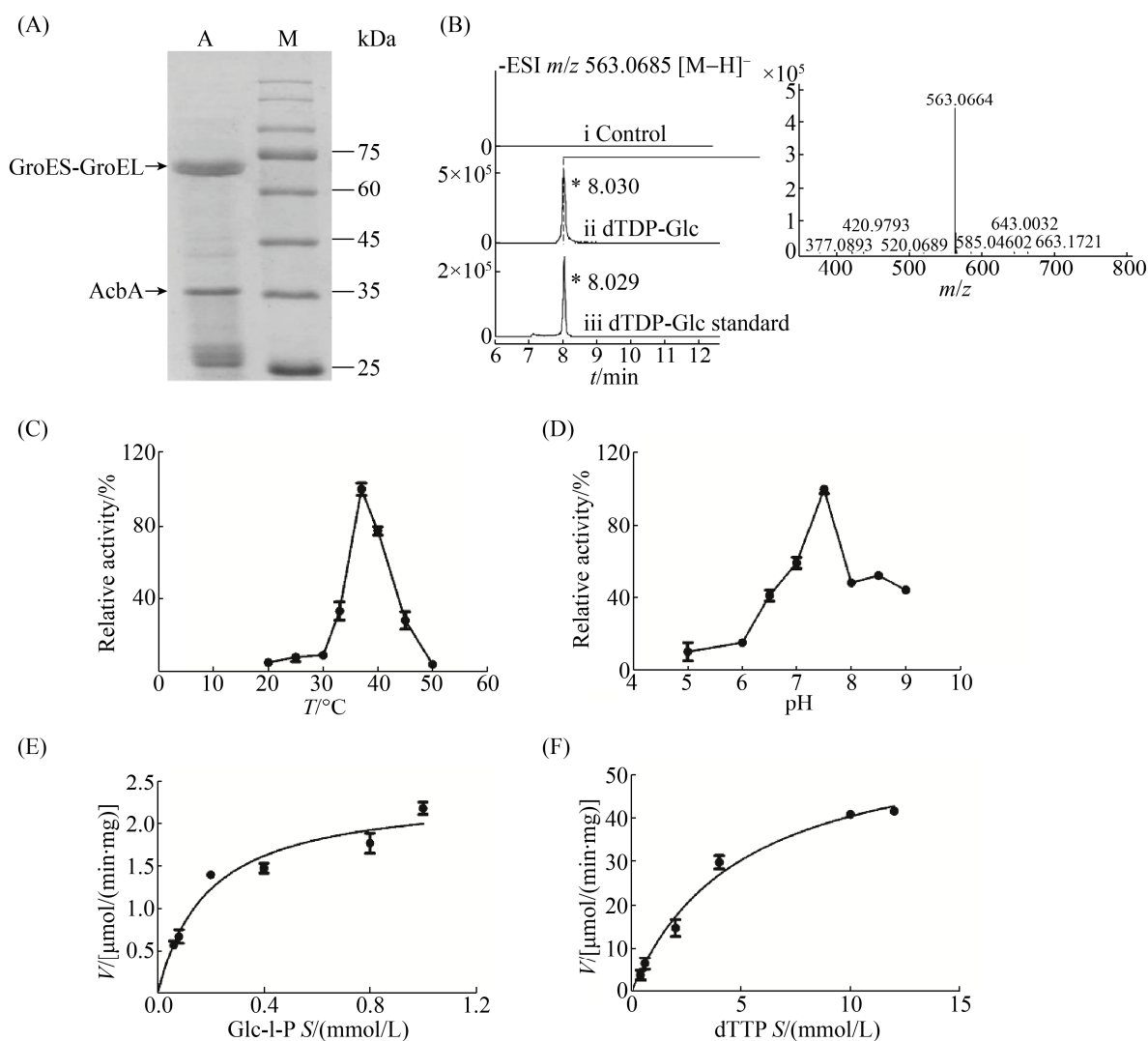


图 3. *AcbA* 蛋白的功能及酶学性质分析

Figure 3. Analyses of enzymatic function and properties of *AcbA*. A: SDS-PAGE analysis; B: LC-ESI-MS analysis; C: Effects of different temperatures on enzyme activity; D: Effects of different pHs on enzyme activity; E: Fitted curve of reaction rate and substrate concentration of *AcbA* at varying D-glucose-1-phosphate concentrations; F: Fitted curve of reaction rate and substrate concentration of *AcbA* at varying dTTP concentrations.

2.2.2 *AcbA* 的酶学性质表征: 为系统了解 *AcbA* 的酶促反应特性, 首先考察了不同温度和 pH 对其催化活性的影响。研究结果显示, *AcbA* 的相对酶活在 20–50 °C 呈现先上升后下降的趋势, 在 37 °C 达到最大值(图 3-C)。而后, 测定了 *AcbA* 在 pH 5.0–9.0 的酶活, 结果显示, 随着 pH 的变化, 酶

活力在 pH 7.5 时达到最高(图 3-D)。因此, *AcbA* 的最适反应温度和 pH 分别为 37 °C 和 7.5。

随后, 在 *AcbA* 的最适反应条件下, 测定了其反应动力学参数。反应体系中 *AcbA* 的浓度为 20 μmol/L, 改变底物 D-葡萄糖-1-磷酸或 dTTP 的添加量进行反应, 反应时间为 8 h。结合

HPLC-QQQMS 定量分析, 通过检测 dTDP-D-葡萄糖的生成量, 计算了不同底物添加量的反应速率。而后, 利用软件 GraphPad Prism 5 绘制了 Michaelis-Menten 拟合曲线(图 3-E、3-F), 计算了 AcbA 对底物 D-葡萄糖-1-磷酸和 dTTP 的 K_m 值分别为(0.185±0.053) mmol/L 和(4.964±1.089) mmol/L, V_{max} 分别为 (2.366±0.217) $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 和 (60.310±5.419) $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ (表 2)。

2.3 AcbB 的功能分析及其酶学性质表征

2.3.1 AcbB 蛋白的表达及其功能分析: AcbB 蛋白为 dTDP-D-葡萄糖-4,6-脱水酶, 催化 dTDP-D-葡萄糖发生分子内脱水反应。为了详细研究该蛋白的功能, 首先进行了蛋白的表达和纯化, 经 SDS-PAGE 分析, 获得了大小约为 41 kDa 的蛋白(图 4-A), 并计算了蛋白的含量为 63.96%。

随后, 参考 dTDP-D-葡萄糖-4,6-脱水酶的反应条件^[25], 按照 1.7.2 所述方法, 以 dTDP-D-葡萄糖为底物, Tris-HCl (pH 8.0)为缓冲液, 加入 1 mmol/L 的 NAD^+ 辅因子和 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ AcbB, 在 30 °C 反应 1 h 后, 利用 2 倍体积的甲醇终止反应。采用 LC-ESI-MS 检测反应产物的生成情况, 发现在 8.4 min 左右抽提出目标产物 dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖 (dTDP-GlcO) 的分子离子峰 ($\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_{15}\text{N}_2\text{P}_2$), $m/z=545.0551$ [$\text{M}-\text{H}$]⁻(计算值 $m/z=545.0579$ [$\text{M}-\text{H}$]⁻), 与 dTDP-GlcO 标准品的

出峰时间和 m/z 一致。而在蛋白失活的对照组中无此产物积累(图 4-B)。该研究结果表明, AcbB 作为 dTDP-D-葡萄糖-4,6-脱水酶, 催化了 dTDP-D-葡萄糖脱水生成 dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖, 为脱氧氨基糖单元合成的第二步反应。

2.3.2 AcbB 的酶学性质表征: 为了分析 AcbB 的酶催化反应特性, 首先评估了不同温度和 pH 对其催化活性的影响。如图 4-C 所示, AcbB 的相对酶活在 20–50 °C 呈现先上升后下降的趋势, 在 37 °C 时活性达到最大值。而后, 测定了 AcbB 在 pH 5.0–9.0 的相对酶活, 结果如图 4-D 所示, 随着 pH 的升高, 酶活先不断升高, 在 pH 8.0 时达到最高后呈下降趋势。因此, AcbB 在温度和 pH 分别为 37 °C 和 8.0 时, 显示了最高的催化效率。

随后, 在最适温度和 pH 条件下, 测定了 AcbB 的酶动力学参数。在反应体系中分别添加了 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 AcbB 蛋白、1 mmol/L 的辅因子 NAD^+ 以及不同浓度的底物 dTDP-D-葡萄糖, 浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L, 反应 1 h 后终止反应。利用 HPLC-QQQMS 定量检测产物 dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖的生成量来计算反应速率, 并拟合计算出 AcbB 蛋白的酶动力学参数(图 4-E 和表 2), 其 K_m 值和 V_{max} 分别为(0.353±0.089) mmol/L 和 (306.401±28.740) $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。

表 2. AcbA、AcbB 和 AcbV 的动力学参数

Table 2. The enzyme kinetic parameters of AcbA, AcbB and AcbV

Protein	Substrate	K_m (mmol/L)	V_{max} [$\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$]
AcbA	D-glucose-1-phosphate	0.185±0.053	2.366±0.217
	dTTP	4.964±1.089	60.310±5.419
AcbB	dTDP-D-glucose	0.353±0.089	306.401±28.740
AcbV	dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose	1.411±0.293	3.447±0.279

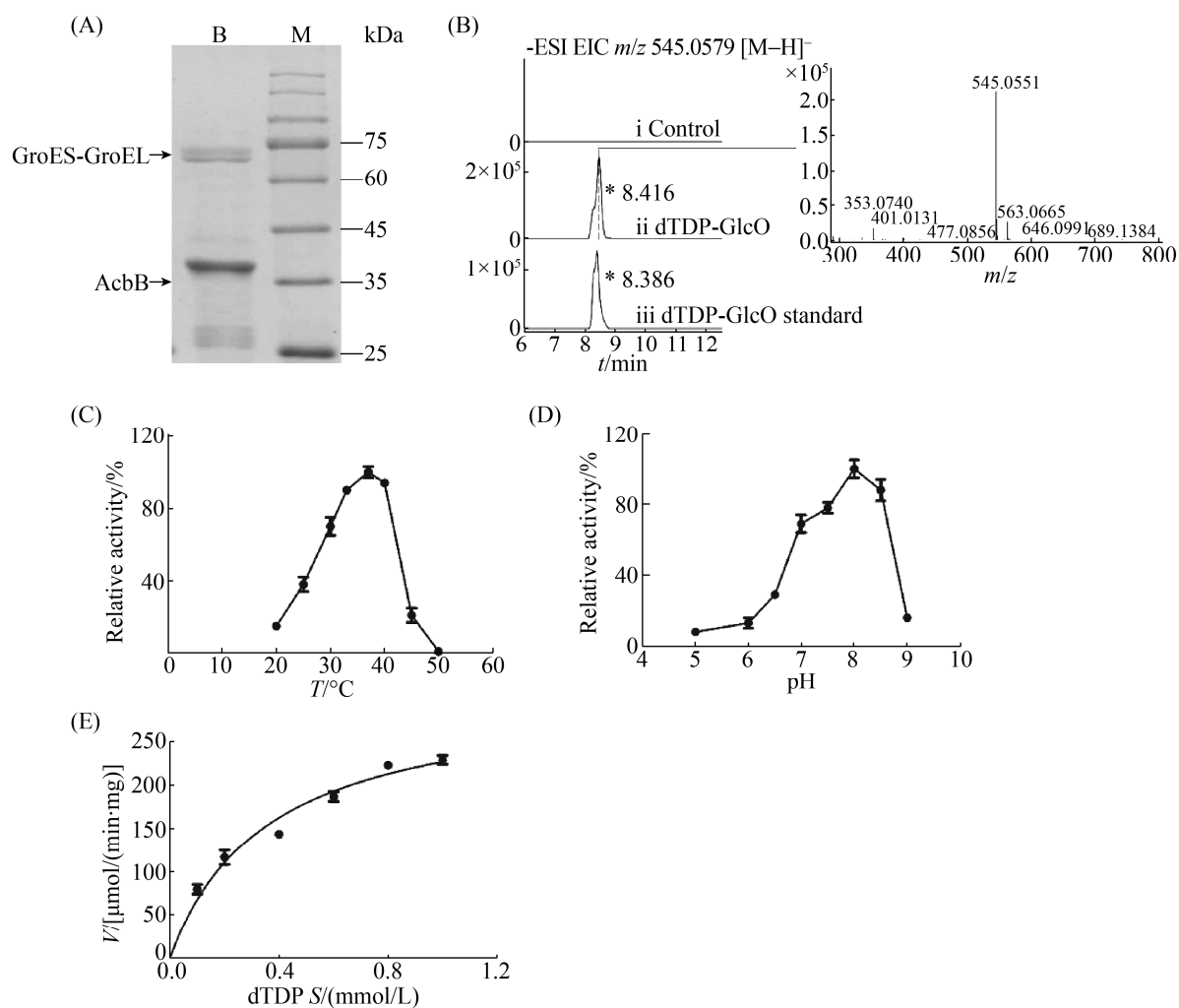


图 4. AcbB 蛋白的功能及酶学性质分析

Figure 4. Analyses of enzymatic function and properties of AcbB. A: SDS-PAGE analysis; B: LC-ESI-MS analysis; C: Effects of different temperatures on enzyme activity; D: Effects of different pHs on enzyme activity; E: Fitted curve of reaction rate and substrate concentration of AcbB at varying dTDP-D-glucose concentrations.

2.4 AcbV 的功能分析及其酶学性质表征

2.4.1 AcbV 蛋白的表达及其功能分析:

AcbV 蛋白是转氨酶, 负责将来自谷氨酸的氨基转移到 dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖的 C-4 位的酮基上, 生成 dTDP-4-氨基-4,6-双脱氧-D-葡萄糖。为了研究 AcbV 的催化功能, 首先构建了 AcbV 的异源表达质粒 pLQ1111, 然后, 将其转化至大肠杆菌 BL21(DE3)/pGro7 中, 进行了蛋白表达条件的优化。经过镍柱亲和层析纯化后, 得到了大小约

为 53 kDa 的蛋白(图 5-A), 利用 GIS 1D 软件定量分析其含量为 71.99%。

随后, 参考 dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖转氨酶的反应条件^[19], 按照 1.7.3 所述方法, 以 dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖为底物、谷氨酸为氨基供体、磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate, PLP) 为辅因子, 加入 20 mmol/L 的 AcbV, 并置于 30 °C 反应 6 h 后终止反应。利用 LC-ESI-MS 检测反应产物, 发现在 9.3 min 处出现目标产物 dTDP-4-氨

基-4,6-双脱氧-D-葡萄糖(dTDP-Qui4N)的分子离子峰($C_{16}H_{27}N_3O_{14}P_2$), 该化合物的质荷比为 $m/z=546.0878$ [M-H]⁻(计算值为 $m/z=546.0895$ [M-H]⁻), 同时, 对照组无此产物积累(图 5-B)。该研究表明, AcbV 蛋白催化了 dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖发生转氨反应, 生成了 dTDP-4-氨基-4,6-双脱氧-D-葡萄糖, 即阿卡波糖脱氧氨基糖单元合成途径的终产物。

2.4.2 AcbV 的酶学性质表征: 为了深入探究 AcbV 的反应特性, 首先考察了不同反应温度和溶液 pH 对其催化活性的影响。如图 5-C 所示, AcbV 的相对酶活在 20–30 °C 时随温度升高不断提高至最大值, 在 30–50 °C 呈下降趋势。而后, 测定了 AcbV 在 pH 5.0–9.0 范围内的相对酶活,

结果如图 5-D 所示, 酶活力在 pH 7.5 时达到最大值。因此, AcbV 的最适反应温度和 pH 分别为 30 °C 和 7.5。

随后, 为计算 AcbV 蛋白的酶动力学参数, 在最适酶反应条件下, 分别添加 1 mmol/L PLP、8 mmol/L L-谷氨酸、20 μmol/L AcbV 蛋白和底物 dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖(浓度分别为 0.4、0.6、0.8、2.0 和 8.0 mmol/L)进行反应, 6 h 后用两倍体积的甲醇终止反应。通过定量检测底物 dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖的消耗量, 计算了 AcbV 的反应速率。最终, 利用软件 GraphPad Prism 5 拟合计算出 AcbV 蛋白的 $K_m=(1.411\pm 0.293)$ mmol/L, $V_{max}=(3.447\pm 0.279)$ μmol/(min·mg) (图 5-E 和表 2)。

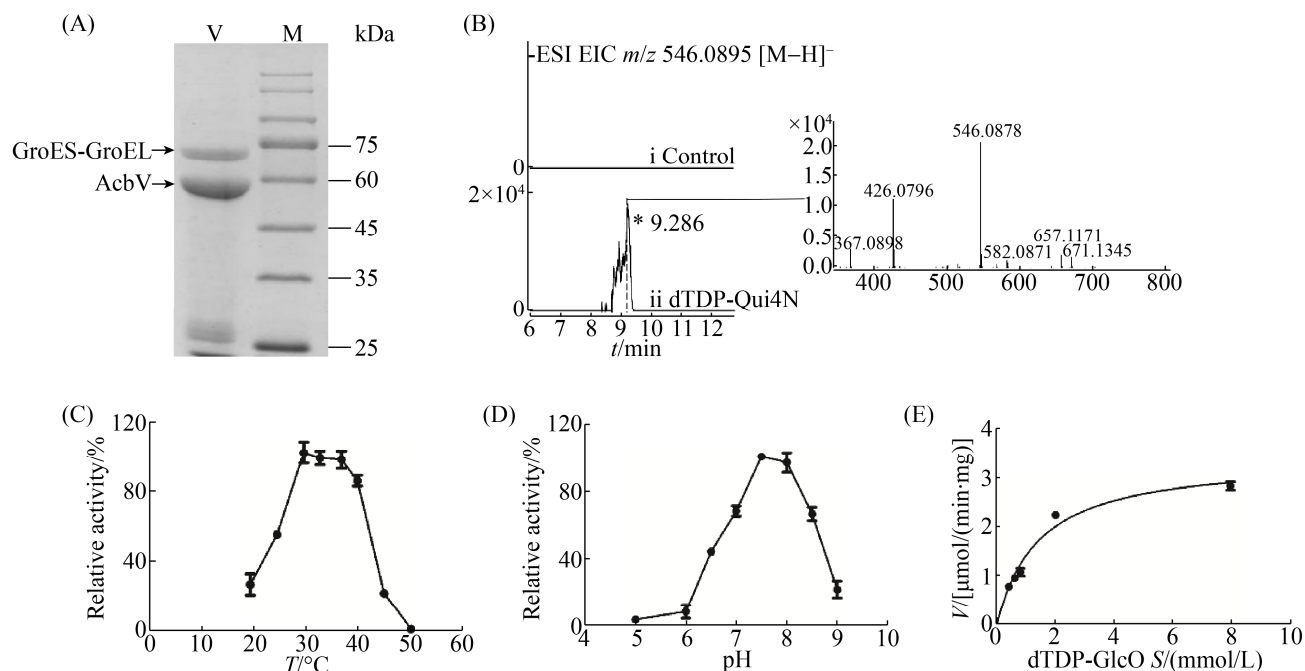


图 5. AcbV 蛋白的功能及酶学性质分析

Figure 5. Analyses of enzymatic function and properties of AcbV. A: SDS-PAGE analysis; B: LC-ESI-MS analysis; C: Effects of different temperatures on enzyme activity; D: Effects of different pHs on enzyme activity; E: Fitted curve of reaction rate and substrate concentration of AcbV at varying dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose concentrations.

3 讨论

通过解析天然产物的生物合成机制来定向指导代谢工程改造是天然产物工业化产量提高的重要手段之一。脱氧氨基糖作为阿卡波糖结构中的重要单元, 研究其合成过程对于全面解析阿卡波糖的生物合成机制, 指导代谢工程改造, 从而提高阿卡波糖的产量具有重要意义。本研究通过生物信息学分析, 推测了负责 SE50/110 中阿卡波糖脱氧氨基糖单元合成的相关基因。而后, 利用体内基因突变与体外酶学分析相结合的研究策略, 系统地解析了阿卡波糖脱氧氨基糖单元的生物合成机制。

通过 BLASTp 分析, 对阿卡波糖生物合成基因簇中编码的蛋白进行了功能预测, 发现编码 AcbA、AcbB 和 AcbV 三个蛋白的基因可能参与阿卡波糖脱氧氨基糖单元的生物合成。在体内研究中, 采用了同源重组无痕敲除的方法, 对 *acbA*、*acbB* 和 *acbV* 基因的功能进行验证, 发现这 3 个基因均参与了阿卡波糖的生物合成, 并结合回补实验确定了这 3 个基因均为阿卡波糖生物合成的必需基因。在体外实验中, 经异源表达、纯化获得了 AcbA、AcbB 和 AcbV 的可溶性蛋白, 并通过酶促反应鉴定了 3 个蛋白的功能及酶学特征, 证实了阿卡波糖脱氧氨基糖单元的生物合成是以 D-葡萄糖-1-磷酸为底物, 依次经 AcbA (D-葡萄糖-1-磷酸胸腺嘧啶转移酶)、AcbB (dTDP-D-葡萄糖-4,6-脱水酶) 和 AcbV (dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖转氨酶) 催化, 分别生成 dTDP-D-葡萄糖、dTDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖

和 dTDP-4-氨基-4,6-双脱氧-D-葡萄糖, 这也表明了阿卡波糖合成过程中其核心部分组装的糖基底物为 dTDP-4-氨基-4,6-双脱氧-D-葡萄糖。同时, 通过逐个摸索酶的最适反应条件, 研究了相关蛋白的酶学性质。对于 dTDP-D-葡萄糖底物, AcbA 蛋白的 k_{cat}/K_m 值为 0.355 L/(min·mmol), 低于已报道的其他细菌中的同工酶。例如 *E. coli* 和 *Salmonella enterica* LT2 中的 RfbA 蛋白, 它们的 k_{cat}/K_m 分别为 173.960 L/(min·mmol) 和 16.041 L/(min·mmol)^[14-15], 说明 AcbA 的催化能力较低。此外, AcbB 蛋白的 k_{cat}/K_m 值为 21.390 L/(min·mmol), 与 *S. enterica* LT2 中 RfbB 蛋白的 k_{cat}/K_m 54.861 L/(min·mmol)^[26] 相近。AcbV 蛋白的 k_{cat}/K_m 值为 0.046 L/(min·mmol), 与 *S. dysenteriae* 中 VioA 蛋白 k_{cat}/K_m 0.013 L/(min·mmol)^[27] 相差不大。蛋白的动力学参数评估结果显示, 在脱氧氨基糖单元合成的第一步中, D-葡萄糖-1-磷酸胸腺嘧啶转移酶(AcbA)的催化活性较低, 这可能是阿卡波糖生物合成过程中的限速步骤。因此, 提高 AcbA 蛋白的胞内表达量, 或表达高活性的异源同工蛋白, 可能有利于阿卡波糖脱氧氨基糖单元的合成, 从而达到提高阿卡波糖产量的目的。

总之, 本研究阐释了阿卡波糖脱氧氨基糖单元的生物合成过程, 为全面解析阿卡波糖生物合成途径奠定了基础。同时, 测定了相关酶的动力学参数, 发现了阿卡波糖生物合成中可能存在的限速步骤, 为代谢工程改造 SE50/110 来提高阿卡波糖产量提供了重要依据。

参考文献

- [1] Campbell LK, White JR, Campbell RK. Acarbose: its role in the treatment of diabetes mellitus. *Annals of Pharmacotherapy*, 1996, 30(11): 1255–1262.
- [2] Feng ZH, Wang YS, Zheng YG. Progress in biosynthesis pathway of acarbose. *Biotechnology Bulletin*, 2011, (8): 60–67. (in Chinese)
冯志华, 王远山, 郑裕国. 阿卡波糖的生物合成途径研究进展. *生物技术通报*, 2011, (8): 60–67.
- [3] Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, Malanda B. IDF diabetes atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2018, 138: 271–281.
- [4] Scully T. Diabetes in numbers. *Nature*, 2012, 485(7398): S2–S3.
- [5] Mahmud T. The C₇N aminocyclitol family of natural products. *Natural Product Reports*, 2003, 20(1): 137–166.
- [6] Wehmeier UF, Piepersberg W. Biotechnology and molecular biology of the α -glucosidase inhibitor acarbose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 63(6): 613–625.
- [7] Wehmeier UF. The biosynthesis and metabolism of acarbose in *Actinoplanes* sp. SE 50/110: a progress report. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2003, 21(4/5): 279–284.
- [8] Yu Z, Li MH, Li N, Zheng LH, Huang J. Effect of *treY* gene inactivation on reducing of acarbose component C in *Actinoplanes* 8-22. *Microbiology China*, 2015, 42(7): 1301–1306. (in Chinese)
余贞, 李美红, 李娜, 郑玲辉, 黄隽. 游动放线菌 8-22 中 *treY* 基因敲除对于降低阿卡波糖 C 组分的作用. *微生物学通报*, 2015, 42(7): 1301–1306.
- [9] Gren T, Ortseifen V, Wibberg D, Schneiker-Bekel S, Bednarz H, Niehaus K, Zemke T, Persicke M, Pühler A, Kalinowski J. Genetic engineering in *Actinoplanes* sp. SE50/110 - development of an intergeneric conjugation system for the introduction of actinophage-based integrative vectors. *Journal of Biotechnology*, 2016, 232: 79–88.
- [10] Wolf T, Gren T, Thieme E, Wibberg D, Zemke T, Pühler A, Kalinowski J. Targeted genome editing in the rare actinomycete *Actinoplanes* sp. SE50/110 by using the CRISPR/Cas9 system. *Journal of Biotechnology*, 2016, 231: 122–128.
- [11] Zhao QQ, Xie HX, Peng Y, Wang XR, Bai LQ. Improving acarbose production and eliminating the by-product component C with an efficient genetic manipulation system of *Actinoplanes* sp. SE50/110. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2017, 2(4): 302–309.
- [12] Liu HW, Thorson JS. Pathways and mechanisms in the biogenesis of novel deoxysugars by bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 1994, 48: 223–256.
- [13] Blankenfeldt W, Giraud MF, Leonard G, Rahim R, Creuzenet C, Lam JS, Naismith JH. The purification, crystallization and preliminary structural characterization of glucose-1-phosphate thymidyltransferase (RmlA), the first enzyme of the dTDP-L-rhamnose synthesis pathway from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 2000, 56(11): 1501–1504.
- [14] Zuccotti S, Zanardi D, Rosano C, Sturla L, Tonetti M, Bolognesi M. Kinetic and crystallographic analyses support a sequential-ordered bi bi catalytic mechanism for *Escherichia coli* glucose-1-phosphate thymidyltransferase. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 313(4): 831–843.
- [15] Lindquist L, Kaiser R, Reeves PR, Lindberg AA. Purification, characterization and HPLC assay of *Salmonella* glucose-1-phosphate thymidyltransferase from the cloned *rfaA* gene. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 211(3): 763–770.
- [16] Feng L, Tao J, Guo HJ, Xu JG, Li YY, Rezwani F, Reeves P, Wang L. Structure of the *Shigella dysenteriae* 7 O antigen gene cluster and identification of its antigen specific genes. *Microbial Pathogenesis*, 2004, 36(2): 109–115.
- [17] Lee HC, Sohng JK, Kim HJ, Nam DH, Han JM, Cho SS, Choi JH, Yoo JC. Cloning and expression of the glucose-1-phosphate thymidyltransferase gene (*gerD*) from *Streptomyces* sp. GERI-155. *Molecules and Cells*, 2004, 17(2): 274–280.
- [18] Sohng JK, Kim HJ, Nam DH, Lim DO, Han JM, Lee HJ, Yoo JC. Cloning, expression, and biological function of a dTDP-deoxyglucose epimerase (*gerF*) gene from *Streptomyces* sp. GERI-155. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(3): 185–191.

- [19] Chung YS, Kim DH, Seo WM, Lee HC, Liou K, Oh TJ, Sohng JK. Enzymatic synthesis of dTDP-4-amino-4,6-dideoxy-D-glucose using GerB (dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose aminotransferase). *Carbohydrate Research*, 2007, 342(11): 1412–1418.
- [20] Lombó F, Siems K, Braña AF, Méndez C, Bindseil K, Salas JA. Cloning and insertional inactivation of *Streptomyces argillaceus* genes involved in the earliest steps of biosynthesis of the sugar moieties of the antitumor polyketide mithramycin. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(10): 3354–3357.
- [21] Bechthold A, Sohng AK, Smith TM, Chu X, Floss HG. Identification of *Streptomyces violaceoruber* Tü22 genes involved in the biosynthesis of granaticin. *Molecular and General Genetics*, 1995, 248(5): 610–620.
- [22] Paget MS, Chamberlin L, Atrih A, Foster SJ, Buttner MJ. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor σ^E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(1): 204–211.
- [23] Wang WS, Li X, Wang J, Xiang SH, Feng XZ, Yang KQ. An engineered strong promoter for Streptomyces. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(14): 4484–4492.
- [24] Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Rao RN, Schoner BE. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 1992, 116(1): 43–49.
- [25] Oh J, Lee SG, Kim BG, Sohng JK, Liou K, Lee HC. One-pot enzymatic production of dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose from dTMP and glucose-1-phosphate. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 84(4): 452–458.
- [26] Romana LK, Santiago FS, Reeves PR. High level expression and purification of dThymidine diphospho-D-glucose 4,6-dehydratase (*rfbB*) from *Salm onella* serovar typhimurium LT2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1991, 174(2): 846–852.
- [27] Wang L, Wang Y, Xu YL, Qi YY, Feng L. Method for synthesizing dTDP-4-amino-4,6-dideoxy-D-glucose, preparation method and use thereof. CN: 200710127579.8. 2007-07-03. (in Chinese)
王磊, 王颖, 徐艳丽, 齐源远, 冯露. 一种利用生物法合成 dTDP-4-氨基-4,6-双脱氧-D-葡萄糖、制备方法及其用途. 中国: 200710127579.8. 2007-07-03.

Biosynthetic pathway of deoxyaminosugar moiety in acarbose from *Actinoplanes* sp. SE50/110

Dan Zhang, Qinqin Zhao, Ming Jiang, Qianjin Kang, Linqun Bai*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Objective] Elucidation of the biosynthetic mechanism of the deoxyaminosugar moiety in acarbose from *Actinoplanes* sp. SE50/110. [Methods] On the basis of BlastP analysis, AcbA, AcbB and AcbV were proposed to be associated with the biosynthesis of deoxyaminosugar moiety. Firstly, the in-frame deletion and trans-complementation of *acbA*, *acbB* and *acbV* were performed in SE50/110 to investigate their involvement in acarbose biosynthesis. Then, AcbA, AcbB and AcbV were heterologously expressed in *E. coli* BL21(DE3)/pGro7 and purified by Ni affinity chromatography. Finally, using D-glucose-1-phosphate as the starting substrate, the biosynthetic process of deoxyaminosugar moiety was elucidated by enzymatic assay. In addition, the properties of these involved enzymes were characterized. [Results] Deletion mutants of *acbA*, *acbB* and *acbV* in SE50/110 were named as ZD03, ZD04 and ZD05, respectively, all of which lost the productivity of acarbose. And then, the production of acarbose was recovered through trans-complementation of *acbA*, *acbB* and *acbV* in ZD03, ZD04 and ZD05, respectively. *In vitro* enzymatic analysis suggested that AcbA, a D-glucose-1-phosphate thymidyltransferase, is responsible for the biosynthesis of dTDP-D-glucose from D-glucose-1-phosphate and dTTP. It showed a K_m of (0.185 ± 0.053) mmol/L and a V_{max} of (2.366 ± 0.217) $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ with D-glucose-1-phosphate, as well as a K_m of (4.964 ± 1.089) mmol/L and a V_{max} of (60.310 ± 5.419) $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ with dTTP. AcbB, a TDP-D-glucose-4,6-dehydratase, catalyzed the dehydration of dTDP-D-glucose to dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose. The K_m and V_{max} of AcbB are (0.353 ± 0.089) mmol/L and (306.401 ± 28.740) $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$, respectively. AcbV is a dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose-aminotransferase and catalyzes the transamination of dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose to dTDP-4-amino-4,6-dideoxy-D-glucose using glutamic acid as amino donor. The K_m and V_{max} of AcbV are (1.411 ± 0.293) mmol/L and (3.447 ± 0.279) $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$, respectively. [Conclusion] This study elucidated the biosynthetic pathway of deoxyaminosugar moiety in acarbose, which paved a solid way for a full elucidation of acarbose biosynthesis. Meanwhile, the characterization of the involved enzymes provided important information for the metabolic engineering of SE50/110 to improve acarbose production.

Keywords: acarbose, deoxyaminosugar, biosynthesis, enzymatic assay

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31830104)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-34206722; E-mail: bailq@sjtu.edu.cn

Received: 18 March 2019; Revised: 13 April 2019; Published online: 11 July 2019