



细菌中酶蛋白硫辛酰化途径研究进展

马建荣¹, 余永红^{1*}, 陈艺彩², 鄢明峰², 张文彬²

¹广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520

²华南农业大学生命科学学院, 广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室, 广东 广州 510642

摘要: 硫辛酸为含有两个硫原子的八碳脂肪酸, 具有很强的抗氧化性, 在保健食品、化妆品和药物等领域都具有良好的应用前景。细胞中硫辛酸是重要的辅因子, 影响多种 α -酮酸脱氢酶活性, 参与能量代谢和物质代谢。模式生物大肠杆菌中酶蛋白硫辛酰化途径研究得较为清楚, 包括依赖于 LipB-LipA 的硫辛酸从头合成途径和依赖于 LplA 的硫辛酸补救合成途径。但随着研究的深入, 发现不同细菌中酶蛋白硫辛酰化途径具有较高的多样性, 部分细菌中 GcvH 蛋白也参与硫辛酰化修饰过程, 相关催化酶类也不尽相同。本文系统总结了硫辛酸依赖的多酶复合体、硫辛酰修饰的结构域和 GcvH 蛋白, 以及不同细菌中酶蛋白硫辛酰化途径多样性的研究进展, 旨在为进一步了解细菌酶蛋白硫辛酰化机制、开发针对性的抗菌药物以及利用生物法高效生产硫辛酸等方面提供理论支撑。

关键词: 硫辛酸, 硫辛酸从头合成途径, 硫辛酸补救合成途径

硫辛酸(lipoic acid)是在 6 位和 8 位碳原子之间连接两个硫原子的八碳饱和脂肪酸, 其化学名称为 1, 2-二硫代戊环-3-戊酸(图 1)^[1]。硫辛酸具有氧化型(LA)和还原型(DHLA)之分, 既具水溶性又具脂溶性, 还具有强抗氧化性, 能直接清除活性氧、螯合重金属离子, 还能再生其他抗氧化剂如维生素 C、谷胱甘肽、硫氧还原蛋白等, 被誉为“万能抗氧化剂”^[2]。由于硫辛酸具有缓解肌体过度疲

劳、延缓衰老、预防记忆力衰退等功效, 在美容养颜、减肥等方面也有功效, 同时硫辛酸也应用于糖尿病、脑和神经退化性疾病以及肝脏类疾病治疗等, 因此硫辛酸在保健食品、化妆品和药品等领域都具有广泛的应用前景^[3-5]。硫辛酸属于维生素 B 类化合物, 在生物体内作为辅因子广泛存在。硫辛酸与酶蛋白中赖氨酸的 ϵ -氨基共价结合, 以酰胺键形式连接, 完成酶蛋白翻译后硫辛酰化

基金项目: 广州市科技计划(202002030422); 国家自然科学基金(31601601); 广东食品药品职业学院院级课题(2019ZR13, 2019ZR17, 2020ZR03); 广东大学生科技创新培育专项资金(“攀登计划”专项资金)(pdjh2020b1010); 广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室开放课题(PFRAO201804)

*通信作者。Tel: +86-20-28194616; E-mail: yuyh@gdyzy.edu.cn

收稿日期: 2020-09-29; 修回日期: 2021-01-16; 网络出版日期: 2021-07-29

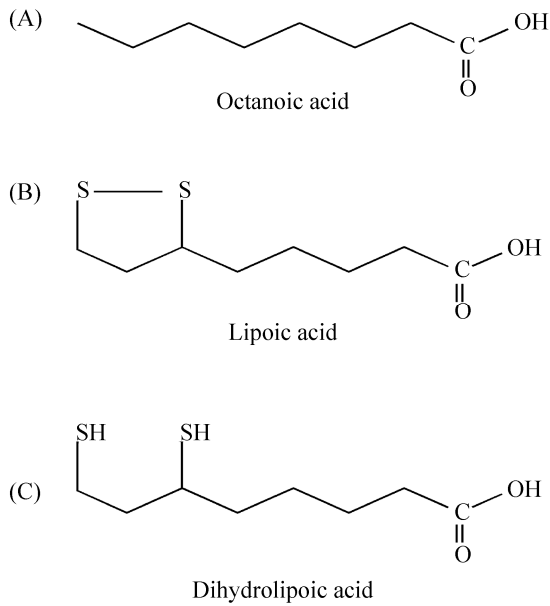


图 1. 辛酸、硫辛酸和二氢硫辛酸的结构

Figure 1. The chemical structures of octanoic acid, lipoic acid and dihydrolipoic acid.

修饰过程, 并维持酶蛋白的催化活性。模式生物大肠杆菌(*Escherichia coli*)中酶蛋白硫辛酰化途径研究最早, 发现了硫辛酸从头合成化途径和硫辛酸补救合成途径。但随着研究深入, 发现不同细菌硫辛酰化途径具有较高的多样性, 革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌和古生菌中酶蛋白硫辛酰化途径差异明显, 两种途径中催化酶类、载体蛋白都具有多样性, 而部分细菌中则只有一种硫辛酰化途径。由于硫辛酸是细菌生长的必需辅因子, 研究细菌中硫辛酰化机制不仅可发现新的抗菌药物靶点, 还可为生物法高产硫辛酸提供理论基础^[6]。为此, 本文将对细菌中酶蛋白硫辛酰化途径的研究进展进行综述。

1 硫辛酸依赖的多酶复合体

虽然硫辛酸作为一种抗氧化剂被广泛使用, 但研究最清楚的是硫辛酸作为辅基参与 α -酮酸脱

氢酶复合体(α -oxo acid dehydrogenase complex)的催化反应, 包括丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)、 α -酮戊二酸脱氢酶(α -oxoglutarate dehydrogenase, OGDH)、支链酮酸脱氢酶(branched-chain ketoacid dehydrogenase, BKDH)和 3-羟基丁酮脱氢酶(acetoin dehydrogenase, ADH)等 4 种复合酶体^[7-8]。其中丙酮酸脱氢酶(PDH)和 α -酮戊二酸脱氢酶(OGDH)参与生物体的能量代谢, 还可以合成中间代谢产物乙酰-CoA、琥珀酰-CoA 等, 作为前体用于氨基酸、脂肪酸的合成。支链酮酸脱氢酶(BKDH)可催化支链酮酸脱羧生成支链脂酰-CoA, 作为前体用于支链脂肪酸合成^[7-8]。部分细菌还编码 3-羟基丁酮脱氢酶(ADH), 催化 3-羟基丁酮分解为乙酰-CoA 和乙醛, 提供生长所需的能量和碳源^[9]。

α -酮酸脱氢酶复合体都含有多拷贝的三种亚基 E1、E2 和 E3, 每种亚基都催化部分反应, 而硫辛酸的羧基与 E2 亚基上保守结构域的赖氨酸残基中 ϵ -氨基共价结合, 催化反应中硫辛酸起在多酶复合体的各个活性中心之间传递中间产物的作用^[9]。 α -酮酸脱氢酶复合体催化反应包括: E1 亚基催化焦磷酸硫胺素依赖的 α -酮酸氧化脱羧, 同时还还原性酰基化 E2 上的硫辛酸基团; E2 亚基催化酰基从硫辛酸基团上转移给 CoA, 产生酰基 CoA; E3 亚基催化硫辛酸基团再氧化, 形成氧化态硫辛酸(图 2)^[10]。在 α -酮酸脱氢酶复合体中, E2 亚基处于复合体中心, E1 和 E3 通过非共价键与之紧密结合^[11]。E1 和 E2 具有底物专一性, E3 在同种细菌中为多种 α -酮酸脱氢酶复合体所共有^[12]。

另外, 硫辛酸作为辅因子也在甘氨酸裂解系统(glycine cleavage system, GCS)中发挥重要作用。甘氨酸裂解系统催化甘氨酸裂解为 CO_2 和 NH_3 , 同时催化合成一碳单位 N^5, N^{10} -亚甲基四氢叶酸(THF)。

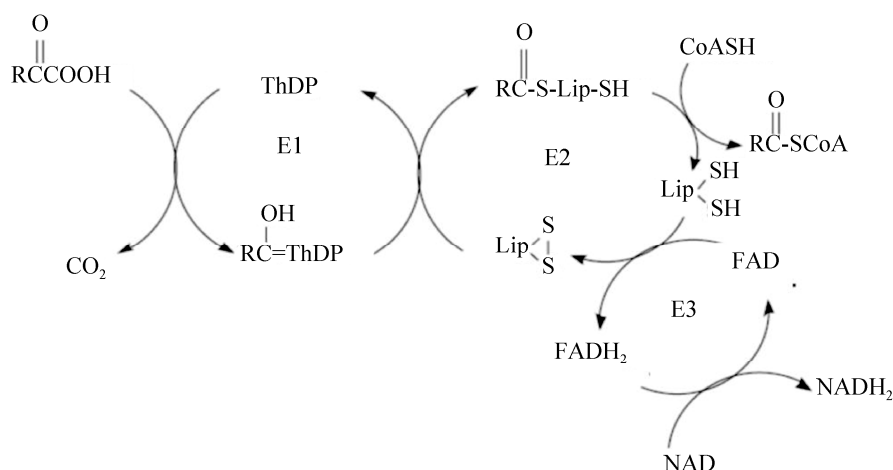


图 2. α -酮酸脱氢酶催化的反应^[8]

Figure 2. The chemical reactions catalyzed by α -oxo acid dehydrogenase complex^[8]. E1: α -oxo acid decarboxylase; E2: acyltransferase; E3: α -oxo acid dehydrogenase subunit; ThDP: thiamine pyrophosphate; Lip: liponic acid; FAD: flavin adenosine dinucleotide.

甘氨酸裂解系统由四种蛋白(GcvP、GcvH、GcvT和GcvL)组成,其中GcvH是硫辛酸的载体蛋白,GcvP催化甘氨酸脱羧,并将剩余的氨基甲基连接到硫辛酸的巯基上,GcvT分解氨基甲基,将一碳单位转移到四氢叶酸(THF)上并释放氨,而GcvL负责GcvH上的二氢硫辛酸再氧化生成硫辛酸,与 α -酮酸脱氢酶复合体的E3亚基类似(图3)^[13]。

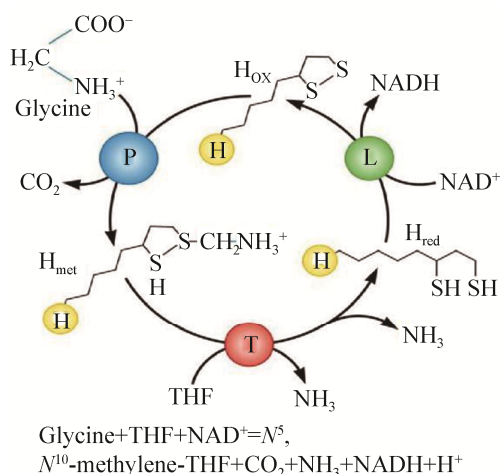


图 3. 甘氨酸裂解系统^[8,14]

Figure 3. Reaction and schematic representation of the glycine cleavage system^[8,14].

2 硫辛酸结构域与 GcvH 蛋白

在 α -酮酸脱氢酶复合体中 E2 亚基含多个结构域,从 N 端开始依次是 3 个硫辛酸结构域(lipoyl domain, LD)、亚基结合结构域和酰基转移酶结构域,各结构域之间由富含丙氨酸、脯氨酸和带电氨基酸组成的多肽链(25–30 氨基酸残基)隔开(图 4-A)^[12,15]。硫辛酸结构域约含有 80 个氨基酸残基,不同来源的硫辛酸结构域蛋白具有保守的空间结构(PDB code 1QJQ),包含 2 个由 4 条 β -折叠链组成的 β -片层,其序列 N 端和 C 端残基靠近,而与硫辛酸结合的赖氨酸残基处在 β -转角中(图 4-B)^[16]。硫辛酸结构域直接参与催化反应中底物传递和活性偶联,也是 E2 亚基在翻译后被硫辛酰化修饰的识别位点。另外,体内体外的研究还证明硫辛酸结构域与 E2 亚基一样,可作为底物被不同酶催化发生硫辛酰化修饰^[17–18]。

大肠杆菌甘氨酸裂解系统中 GcvH (EcGcvH) 蛋白也需要硫辛酰化修饰后才能发挥作用。EcGcvH (PDB code 3AB9)具有 129 个氨基酸,其

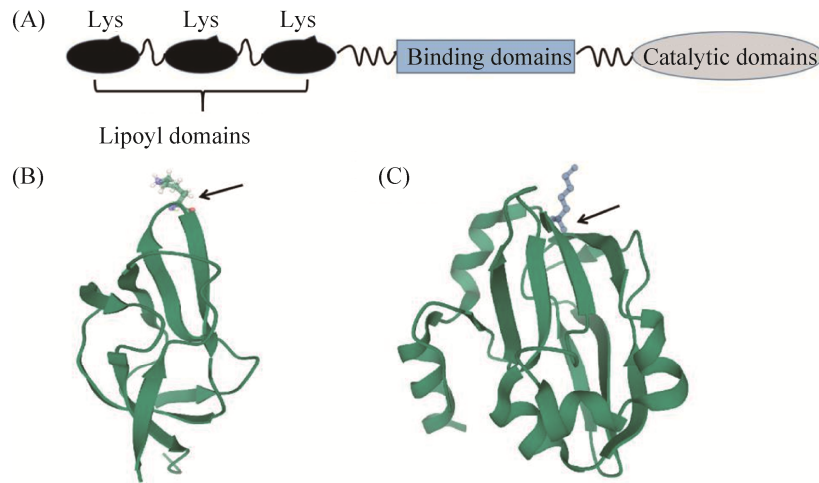


图 4. 大肠杆菌丙酮酸脱氢酶 E2 亚基(A)、硫辛酸结构域(B)和 GcvH 蛋白(C)

Figure 4. The E2 subunit of pyruvate dehydrogenase (A), lipoyl domain (B) and GcvH protein in *E. coli*. The PDB codes of *E. coli* lipoyl domain and GcvH are 1QJQ and 3AB9, respectively.

序列与丙酮酸脱氢酶 E2 亚基的硫辛酸结构域序列相似性较低(氨基酸序列一致性<20%), 但具有高度相似的空间结构, 也含有保守的赖氨酸残基与硫辛酸共价结合(图 4-C)^[7,19]。大肠杆菌中硫辛酰化修饰可直接在 GcvH 蛋白或 α -酮酸脱氢酶复合物 E2 亚基的硫辛酸结构域上完成, 但枯草芽孢杆菌只能首先在 GcvH 上完成硫辛酰化修饰, 再转移到 E2 亚基的硫辛酸结构域上(见下文), 因此其 GcvH 不仅参与甘氨酸裂解, 还负责完成硫辛酰化转运^[20]。具有类似双功能(甘氨酸裂解和硫辛酰化修饰)的 GcvH 被陆续报道, 如 *Aquifex aeolicus* 中 5 个 GcvH 同源蛋白中, 2 个(GcvH1 和 GcvH4)具有双功能, 而其他 3 个只在甘氨酸裂解中发挥作用^[21]。

3 大肠杆菌中酶蛋白硫辛酰化途径

模式生物大肠杆菌有两种酶蛋白硫辛酰化途径: 硫辛酸从头合成途径和硫辛酸补救合成途径, 两种途径相互补充(图 5)^[13]。硫辛酸从头合成途径

是指大肠杆菌以辛酰 ACP (acyl carrier protein)为底物从头合成硫辛酸, 并完成酶蛋白硫辛酰化修饰; 硫辛酸补救合成途径是指细菌从生长环境中直接获得硫辛酸, 并完成酶蛋白硫辛酰化修饰。当生长环境中存在硫辛酸时, 细菌首先利用外源硫辛酸完成酶蛋白修饰; 而当环境中缺乏硫辛酸时, 细菌则通过从头合成途径合成硫辛酸供给细胞利用。

3.1 硫辛酸从头合成途径

大肠杆菌中硫辛酸从头合成途径以脂肪酸合成代谢中间产物辛酰 ACP 为底物, 在辛酰转移酶(LipB)催化下, 将辛酰基团转移到 α -酮酸脱氢酶 E2 亚基的硫辛酸结构域上, 进一步在硫辛酸合成酶(LipA)催化下, 在辛酰基团的 6 位和 8 位碳原子之间连接两个硫原子形成硫辛酰化蛋白亚基(图 5)^[13,22-23]。

大肠杆菌 LipB 是一个大约为 29 kDa 的单体蛋白(PDB code 2QHV), 能够以辛酰 ACP 为底物, 催化辛酰基团转移并与 LipB 中第 169 位半胱氨酸

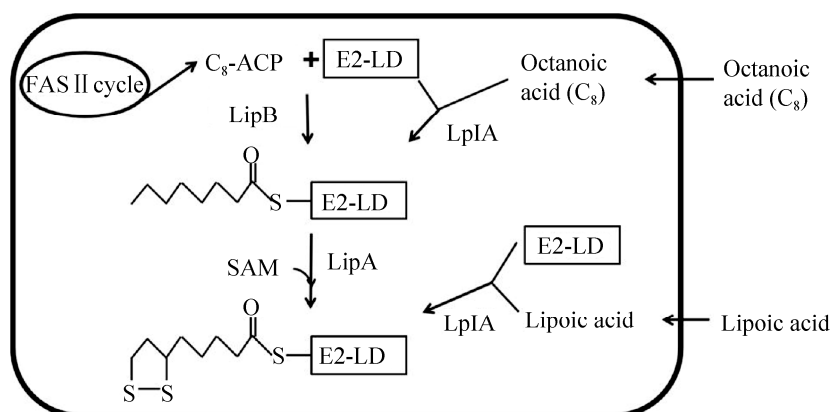


图 5. 大肠杆菌中酶蛋白硫辛酰化途径

Figure 5. Protein lipoylation pathways in *E. coli*. E2-LD refers to the lipoyl domain in the E2 subunit of α -oxo acid dehydrogenase.

(Cys169)生成硫脂键,而后进一步将辛酰基团转到 E2 亚基(或 GcvH 蛋白)中,与硫辛酸结构域中赖氨酸相连形成酰胺键^[22,24]。而晶体结构研究也证明 LipB 为新型半胱氨酸/赖氨酸二元酰基转移酶,半胱氨酸/赖氨酸残基在催化过程中发挥酸/碱催化作用^[17,25]。

大肠杆菌 LipA 属于 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)自由基酶超级家族,含有由 3 个保守的半胱氨酸组成的 CX₃CX₂C 簇,而 N 端保守的 CX₄CX₅C 辅助簇在硫辛酸合成中也发挥重要作用(PDB code 5EXJ)^[26]。大肠杆菌 LipA 以同质二聚体形式存在,含有 SAM 自由基[4Fe-4S]簇和辅助[4Fe-4S]簇,而 1 个 LipA 单体的辅助[4Fe-4S]簇为硫辛酸合成提供 2 个硫原子^[27]。LipA 催化硫辛酸合成可分为两步进行,首先[4Fe-4S]簇裂解 S-腺苷甲硫氨酸生成甲硫氨酸和 5'-脱氧腺苷自由基,后者攻击辛酰基团上第 6 位碳原子,由此产生的碳中心自由基攻击 LipA 的辅助簇,与辛酰基团生成共价连接;而第 2 个 5'-脱氧腺苷自由基则攻击辛酰基团的第 8 位碳原子,生成的碳中心自由基攻击第 2 个辅助

簇,并最终生成还原型的二氢硫辛酸^[28]。

大肠杆菌 LipA 催化硫辛酸合成后,其辅助[4Fe-4S]簇可由 Fe-S 簇载体蛋白 NfuA 介导再生^[29]。大肠杆菌 NfuA(EcNfuA)蛋白的 C 端半胱氨酸残基在 Fe-S 簇生成中发挥作用,而 N 端 A-type 域在与 LipA 互作中发挥关键作用^[30-31]。结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)来源的 MtNfuA 也能催化大肠杆菌 LipA 的辅助簇再生,但金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的 Nfu (SaNfu)由于缺乏 A-type 域不能促进再生,而将 EcNfuA 的 N 端结构域连接到 SaNfu 上,则能恢复 SaNfu 活性^[32]。

3.2 硫辛酸补救合成途径

大肠杆菌中硫辛酸补救合成途径依赖于硫辛酸连接酶 LplA。该反应分两步催化,首先 LplA 催化硫辛酸与 ATP 结合生成活化的中间产物硫辛酰-AMP,并释放出焦磷酸;而后 LplA 催化硫辛酰基团从硫辛酰-AMP 转移到 α -酮酸脱氢酶复合体 E2 亚基的硫辛酸结构域(或 GcvH)上,与保守的赖氨酸残基中 ϵ -氨基生成酰胺键,并伴随 AMP 的释放^[24,33](图 5)。

大肠杆菌 *lipA* 是第一个被发现的硫辛酸连接酶基因, 其编码产物也是第一个被纯化出来的硫辛酸连接酶。大肠杆菌 LplA 为单体蛋白, 分子量为 38 kDa, 可独立催化硫辛酸的活化和转移两个反应, 但其在体内和体外对辛酸也有催化活性, 具有底物广泛性^[34]。虽然大肠杆菌 LipB 和硫辛酸连接酶 LplA 没有序列相似性, 催化不同的化学反应, 但两者具有相似的 3D 结构, 大肠杆菌 LipB 对硫辛酰 ACP 也具有较弱的催化活性, 而大肠杆菌 LplA 也有微弱的 LipB 功能^[35]。

晶体结构分析发现大肠杆菌 LplA (PDB code 3A7R) 包含一个大的 N 末端结构域和一个小的 C 末端结构域, 底物结合口袋存在于两结构域之间, 硫辛酸通过疏水作用和羧基端的氢键作用与 LplA 结合^[34]。比较不同来源的硫辛酸连接酶, 发现 LplA 含有 3 个保守的基序(motifs), 基序 I 为(RRXXGGG XV(F/Y)HD), 其中第 1 个 Arg (R)在与硫辛酸结构域的相互作用过程中起重要作用; 基序 II 为(KhXGXA), 其中 Lys (K)是严格保守的氨基酸, 在硫辛酰-AMP 生成和硫辛酸转移过程中都发挥关键性作用; 基序 III 为(HXX(L/M)LXXX(D/N) LXXLXXhL), 其中 X 代表任何氨基酸, 而 h 代表疏水氨基酸(图 6)^[33,36]。这些保守区域的结构分析

对酶活性鉴定具有重要的参考价值。

4 不同细菌中硫辛酸从头合成途径多样性

大肠杆菌中硫辛酰化途径关键酶同源蛋白在真菌、植物、原生生物和哺乳动物中不断被发现, 揭示该途径在不同物种间广泛存在, 尽管具体的催化机制可能有差别。但随着研究的深入, 发现不同细菌中硫辛酸从头合成途径具有多样性^[8]。革兰氏阳性细菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)编码具有催化功能的大肠杆菌 LipA 同源蛋白, 但基因组中没有大肠杆菌 *lipB* 同源基因^[37]。生物信息学分析显示, 枯草芽孢杆菌含有 3 个硫辛酸连接酶同源蛋白编码基因, 其中 LipM (BsLipM)为辛酰转移酶。虽然 BsLipM 和大肠杆菌 LipB 只有 20% 的序列一致性, 但两者的催化功能和催化机制相似, 以脂肪酸合成代谢中间产物辛酰 ACP 为底物, BsLipM 将辛酰基团转移到其 C150 位点上, 生成硫脂键相连的中间产物, 而后进一步将辛酰基团转移到枯草芽孢杆菌 GcvH 中(图 7-A)^[38]。BsLipM 也能以辛酰-CoA 为底物, 催化辛酰基团转移到 GcvH 上, 但活性较弱。BsLipM 为新型辛酰转移

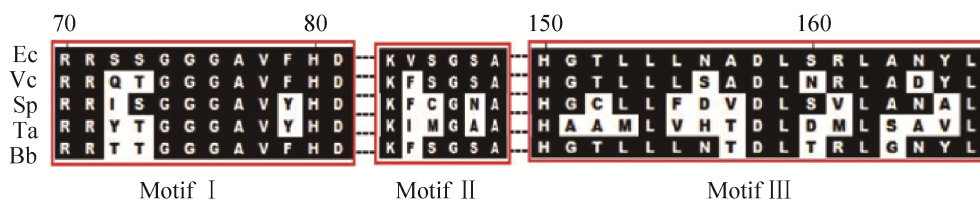


图 6. 不同细菌来源的 LplA 序列比对

Figure 6. Sequence alignment of LplAs from different bacteria. Ec: *E. coli* (SWISS-PROT accession code: P32099); Ta: *T. acidophilum* (Q9HKT1); Vc: *Vibrio cholerae* (Q9KS71); Bb: *Bdellovibrio bacteriovorus* (P60809); Sp: *S. pneumoniae* (Q8DPR1). The residue numbering on the top refers to EcLplA.

酶,其中 C150 和 K165 是催化活性的关键氨基酸,而 BsLipM 同源蛋白广泛分布于厚壁菌门和蓝藻中^[39]。但 BsLipM 不能将辛酰基团转移到 α -酮酸脱氢酶复合物的 E2 亚基上,也说明枯草芽孢杆菌中还有其他酶参与硫辛酸的从头合成。

枯草芽孢杆菌中硫辛酸从头合成还需要 LipL(BsLipL)参与, *BslipL* 突变株是硫辛酸营养缺陷型,但培养基中即使添加硫辛酸也只能部分恢复 $\Delta lipL$ 的生长,说明 BsLipL 还影响硫辛酸补救合成途径(详见下文)^[20]。而 $\Delta lipL$ 菌株无细胞提取物中硫辛酰化修饰的 GcvH 出现累积,但由于 E2 亚基不能被硫辛酸修饰,细胞内 α -酮酸脱氢酶复合物没有活性。*BslipL* 基因不能互补大肠杆菌 *lipB* 突变株,但大肠杆菌 *lipB* 能恢复 $\Delta lipL$ 菌株在基础培养基上生长,证明 BsLipL 和 BsLipM 在 E2 亚基的辛酰修饰中发挥作用^[20]。在大肠杆菌中表达 BsLipL,检测发现其 C39 和 C150 位发生硫辛酰或辛酰修饰。因此 BsLipL 是一种新的氨酰转移酶,以辛酰-GcvH 为底物,催化辛酰基团转移到丙酮酸脱氢酶的 E2 亚基上,其中 C39 位点突变不

影响催化活性,而 C150 为活性关键位点,与 BsLipB 和 BsLipM 类似, BsLipL 具有 Cys-Lys 二元催化活性中心,但 BsLipL 与其他氨酰转移酶没有序列或结构的相似性^[20]。而在枯草芽孢杆菌中, GcvH 蛋白也是硫辛酸合成的关键蛋白, *gcvH* 突变株为硫辛酸营养缺陷型(图 7-A)。

人类条件致病菌金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)也具有与枯草芽孢杆菌类似的硫辛酰化途径,其基因组编码硫辛酸合成关键酶 SaLipM、SaLipA 和 SaLipL,其中 SaLipM 与 BsLipM 具有 62%的序列一致性,也具有类似的功能,即催化辛酰基团从辛酰 ACP 转移到 GcvH 上^[40]。但与枯草芽孢杆菌的硫辛酸从头合成步骤不同,金黄色葡萄球菌中硫辛酸合成酶 SaLipA 以辛酰-GcvH 为底物,催化在 C6 和 C8 位连接 2 个硫原子生产硫辛酰-GcvH,而后氨酰转移酶 SaLipL 再将硫辛酰基团转移不同脱氢酶复合体的 E2 亚基上,完成内源性硫辛酰化修饰过程(图 7-B)^[41]。金黄色葡萄球菌中硫辛酸从头合成途径在对寄主的全身性感染中发挥关键作用^[42]。

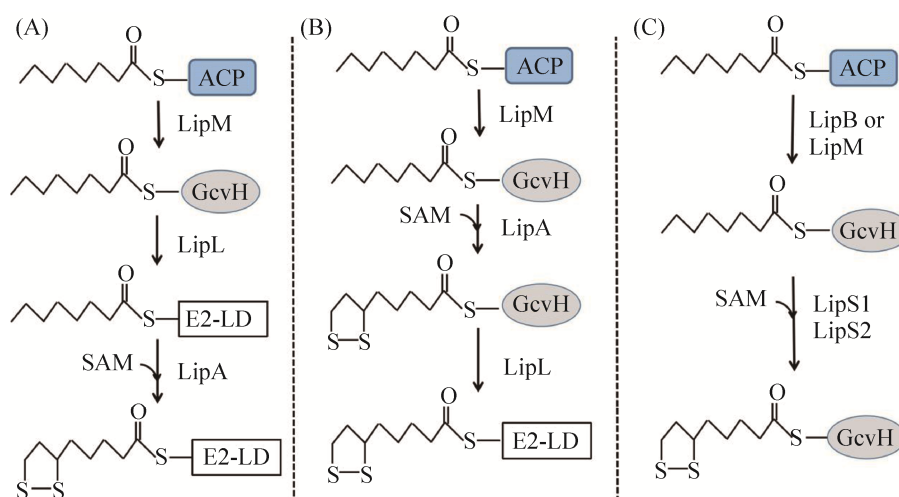


图 7. 不同细菌中硫辛酸从头合成途径

Figure 7. The lipoic acid *de novo* synthetic pathways in different bacteria. A: *B. subtilis*; B: *S. aureus*; C: *Thermococcus kodakarensis*. E2-LD refers to the lipoyl domain in the E2 subunit of α -keto acid dehydrogenase.

嗜热古生菌 *Thermococcus kodakarensis* 生长不需要添加硫辛酸,但其基因组不编码 LipA 同源蛋白,推测该菌具有新的硫辛酸从头合成途径。生物信息学分析发现 2 个标注为生物素合成酶 TK2109 (LipS1)和 TK2248 (LipS2)可能参与硫辛酸合成代谢,但 LipS1 和 LipS2 与大肠杆菌 LipA、嗜热古生菌 *Sulfolobus solfataricus* LipA (SSO3158) 的序列一致性都低于 20%。*lipS1* 敲除突变株和 *lipS2* 敲除突变株均为硫辛酸的缺陷型,而体外实验发现单独 LipS1 或 LipS2 都不能以催化辛酰-GcvH 生成硫辛酰产物,但 LipS1 和 LipS2 能共同催化反应发生,生成硫辛酰-GcvH,证明两者都是催化活性必需的(图 7-C),而 LipS1 和 LipS2 同源蛋白在嗜热古生菌中广泛存在^[43]。但 *Thermococcus kodakarensis* 中辛酰转移酶 LipB 或者 LipM 同源蛋白还没有被鉴定,而 LipS1 和 LipS2 催化生成硫辛酰-GcvH 后,硫辛酰基团如何转移到 α -酮酸脱氢酶复合体也还不清楚。

5 不同细菌中硫辛酸补救合成途径的多样性

许多细菌可以从环境中“觅食(scavenge)”硫辛酸,但培养基或肠道环境中硫辛酸通常与载体蛋白相结合,而部分细菌可编码硫辛酰基转移酶(lipoamidase)将硫辛酸解离下来,并以自由扩散方式进入细胞内,再通过硫辛酰基转移酶催化生成硫辛酰-GcvH 或硫辛酰-E2 亚基,完成酶蛋白的硫辛酰化修饰^[44-45]。虽然与模式生物大肠杆菌类似的硫辛酸补救合成途径被陆续报道,但不同细菌中该途径也有较大差异。

生物信息学分析显示,枯草芽孢杆菌基因组

编码 3 个硫辛酰基转移酶同源蛋白,但只有 BsLplJ 具有硫辛酰基转移酶活性。BsLplJ 与大肠杆菌 LplA (EcLplA)序列一致性为 33%,体外检测发现对硫辛酰基和辛酰基都具有催化活性,可以将其连接到 GcvH 上。 α -酮戊二酸脱氢酶(OGDH)复合体中 E2 亚基也是 BsLplJ 的催化底物, BsLplJ 可利用外源硫辛酰基完成 OGDH 的硫辛酰化修饰(图 8-A)^[20,39]。但枯草芽孢杆菌 *BslipL* 突变株在添加硫辛酰基的培养基上也不能完全恢复生长,说明 BsLipL 还参与硫辛酰基补救合成过程。*BslipL* 突变株中硫辛酰化 GcvH 出现累积,表明 BsLipL 在催化硫辛酰基团转移到 E2 亚基中发挥关键作用,同时 BsLipL 还能将 OGDH 上的硫辛酰基团转移到丙酮酸脱氢酶(PDH)、支链酮酸脱氢酶(BKDH)的 E2 亚基上,完成硫辛酰化修饰过程(图 8-A)^[46]。与大肠杆菌 LplA 不同, BsLplJ 只能催化 GcvH 和 OGDH 的 E2 亚基,而不能直接完成 PDH 和 BKDH 的 E2 亚基硫辛酰化修饰,将不同多酶复合体的 E2 亚基、GcvH 序列比对发现, PDH 和 BKDH 的 E2 亚基中硫辛酰化修饰位点 Lys (K)上游第 3 个氨基酸由保守的谷氨酸(酸性氨基酸)分别变成了谷氨酰胺、甲硫氨酸,将 OGDH 中该位点的谷氨酸突变为谷氨酰胺则失去活性,而将 PDH 中谷氨酰胺突变为谷氨酸则恢复活性,充分证明该位点是 BsLplJ 底物识别的关键位点^[46]。

古生菌 *Thermoplasma acidophilum* 基因组编码 2 个大肠杆菌 LplA 同源蛋白 TaLplA 和 TaLplB,但只有同时表达 *TalplA* 和 *TalplB* 才能恢复大肠杆菌 *lplA* 和 *lipA* 双突变株的生长^[47]。与 EcLplA 相比, TaLplA 缺乏 C 端结构域(C-terminal domain, CTD),但可催化硫辛酰基与 ATP 连接生成硫辛酰-AMP,并稳定结合在 TaLplA 蛋白的 U 型口袋中(PDB code 2ARS)^[33]。

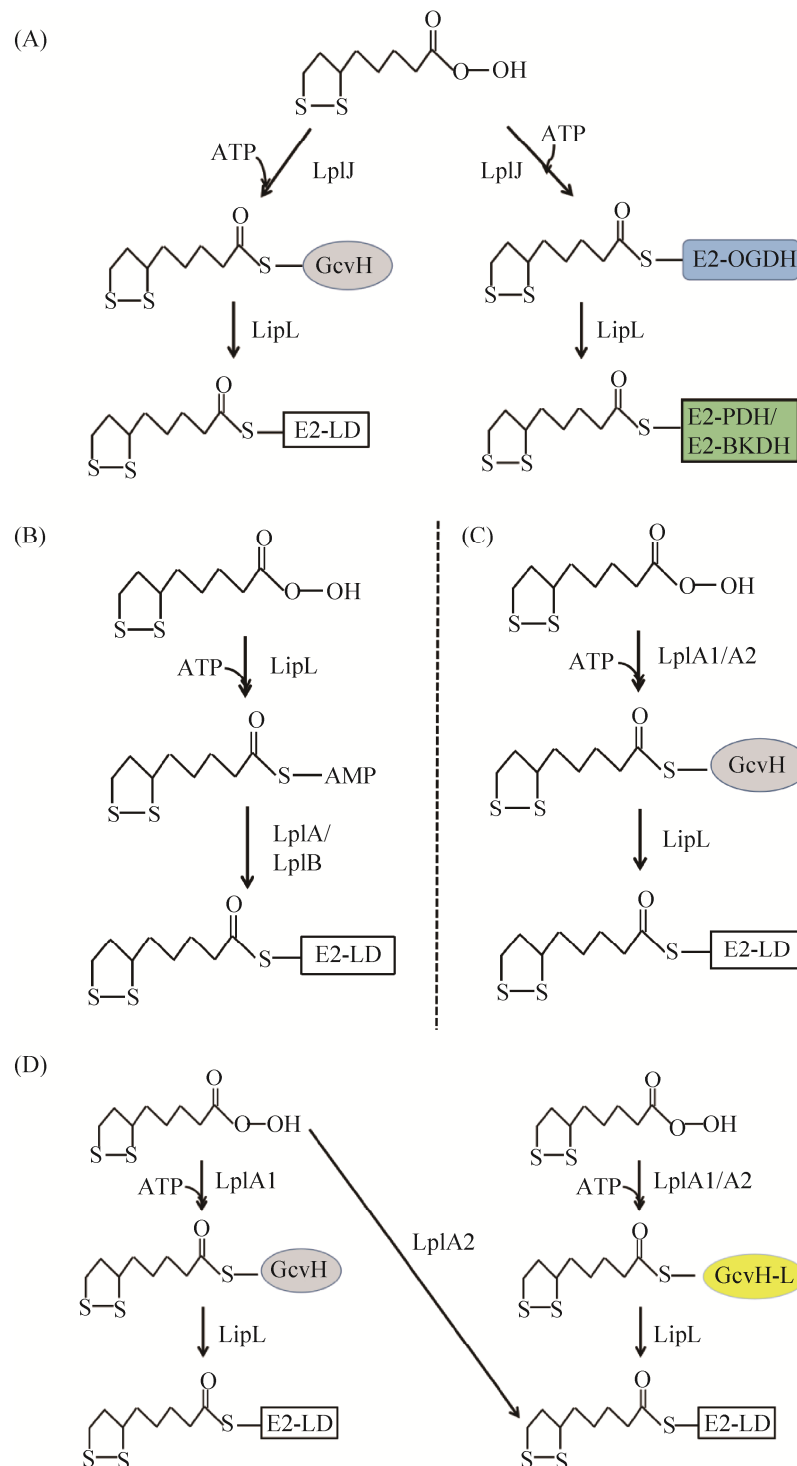


图 8. 不同细菌中硫辛酸补救合成途径

Figure 8. The lipoic acid salvage pathways in different bacteria. A: *B. subtilis*; B: *T. acidophilum*; C: *L. monocytogenes*; D: *S. aureus*. E2-LD refers to the lipoyl domain in the E2 subunit of α -oxoacid dehydrogenase; OGDH: α -oxoglutarate dehydrogenase; PDH: pyruvate dehydrogenase; BKDH: branched-chain ketoacid dehydrogenas.

但 TaLplA 不能进一步将硫辛酸从硫辛酰-AMP 连接到载体蛋白上, 证明 EcLplA 中 C 端结构域在催化硫辛酸第二步转移中发挥关键作用(图 8-B)。而只有当 TaLplB 与 TaLplA 协作, 才能进一步将硫辛酰基团转移到载体蛋白上, 但 TaLplB 不与硫辛酸结构域直接相互作用。以上结果说明硫辛酸连接酶可以拆分为 2 个部分, 当两者同时存在时, 即可完成催化作用(图 8-B)^[47-48]。同时生物信息学分析发现古生菌中硫辛酸连接酶都是异二聚体^[47]。

天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)基因组只编码一个硫辛酸连接酶 ScLplA, 但与已知的硫辛酸连接酶序列一致性较低(<25%), 而且硫辛酸连接酶保守的 C 端结构域出现在 ScLplA 的 N 端^[49]。体内异体遗传互补和体外活性分析都证明 ScLplA 具有硫辛酸连接酶活性。将 2 个结构域模拟 EcLplA 序列重排后的蛋白依然具有硫辛酸连接酶活性, 两个结构域在催化硫辛酰-AMP 形成过程中都发挥作用, 而仅大结构域可催化将硫辛酸从硫辛酰-AMP 连接到受体蛋白上^[49]。

单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)是革兰氏阳性厚壁菌门的人类致病菌, 为硫辛酸营养缺陷型, 需要吸收外源硫辛酸才能生长^[50]。单增李斯特菌编码两个硫辛酸连接酶 LmLplA1 和 LmLplA2, 在基础培养基中添加 25 $\mu\text{mol/L}$ 硫辛酸时, 表达 *LmplA1* 或 *LmplA2* 都能恢复大肠杆菌 *lplA* 和 *lipA* 双突变株生长, 但在基础培养基中只添加极微量硫辛酸(25 nmol/L)时, 只有表达 *LmplA1* 能恢复大肠杆菌 *lplA* 和 *lipA* 双突变株的生长, 表明 LmLplA1 的催化活性要显著高于 LmLplA2^[44]。体外实验证明 LmLplA1 与枯草芽孢杆菌 BsLipJ 类似, 能催化硫辛酸连接到 GcvH 上, 但不能将脱氢酶复合物 E2 亚基硫辛酰化(图

8-C)^[44]。单增李斯特菌还编码氨酰转移酶 LipL (LmLipL), LmLipL 能与丙酮酸脱氢酶复合物结合, 可逆性催化硫辛酰基团从 GcvH 蛋白转移到脱氢酶复合物的 E2 亚基上, 说明 LmLipL 在硫辛酸的吸收利用过程中也是必不可少的(图 8-C)。单增李斯特菌也编码以 Mn^{2+} 离子为辅因子的新型硫辛酸酰胺酶 Lpd, 将连接在蛋白上的硫辛酰基团解离, 并被 LmLplA1 催化吸收^[44]。

与大肠杆菌类似, 金黄色葡萄球菌也同时具有硫辛酸从头合成途径和硫辛酸补救合成途径, 其中从头合成途径是感染心脏时所必需的, 而补救合成途径在感染肾脏过程中是关键的^[40,42]。与单增李斯特菌类似, 金黄色葡萄球菌也编码 2 个硫辛酸连接酶 SaLplA1 和 SaLplA2, 两者都具有催化活性^[40,51]。金黄色葡萄球菌还编码 2 种 H 蛋白, 甘氨酸裂解系统的 SaGcvH 和同源蛋白 SaGcvH-L, 后者编码基因与 *SalplA2* 位于同一个操纵子中。SaLplA1 能将硫辛酸连接到两种 H 蛋白(SaGcvH 和 SaGcvH-L)上, 而 SaLplA2 能将硫辛酸连接到酮酸脱氢酶复合体的 E2 亚基上, 也能将硫辛酸连接到 SaGcvH-L 蛋白上。SaGcvH 和 SaGcvH-L 上的硫辛酰基团可以进一步被硫辛酸转移酶 SaLipL 催化连接到 E2 亚基上(图 8-C)^[41]。SaLplA1 和 SaLplA2 都能以辛酸作为底物, 催化连接到 SaGcvH 和 SaGcvH-L 上, 而后在 SaLipA 催化下生产硫辛酸, 因此金黄色葡萄球菌在感染寄主过程中有多种方式完成硫辛酰化修饰以维持生长^[52]。

猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*)中 Lpl 蛋白具有硫辛酸连接酶活性, 体外可将硫辛酸活化为硫辛酰-AMP, 并进一步转移到其 GcvH 蛋白上。酶活性分析发现其 K56 残基与硫辛酸共价连接, 其 N 端结构域含有完整的催化活性^[53]。

6 总结和展望

虽然半个多世纪前我们已经了解硫辛酸的结 构及其在细菌代谢中的作用，但细菌中酶蛋白硫 辛酰化途径在近 10 多年才被逐渐研究清楚^[7]。模 式生物大肠杆菌中酶蛋白硫辛酰化途径研究较为

清楚，包括依赖于 LipB-LipA 的硫辛酸从头合成 途径和依赖于 LplA 的硫辛酸补救合成途径，相关 催化酶作用机制也比较透彻，为研究不同细菌中 酶蛋白硫辛酰化途径奠定了重要的基础。但不同 细菌中硫辛酰化途径具有较高的多样性(表 1)，革 兰氏阳性细菌中 LipL 和 GcvH 蛋白在 2 种硫辛酰

表 1. 不同细菌中酶蛋白硫辛酰化途径总结

Table 1. Summary of protein lipoylation pathways in different bacteria

Different bacteria	Lipoic acid <i>de novo</i> synthetic pathway	Lipoic acid salvage pathway
G⁻		
<i>Escherichia coli</i>	LipB-LipA pathway Using octanoyl-ACP as a substrate, LipB catalyzes the formation of octanoyl-LD, then LipA catalyzes the formation of lipoyl-LD	LplA LplA catalyzes the formation of lipoyl-LD with free lipiolic acid No
<i>Xanthomonas campestris</i>		No
G⁺		
<i>Bacillus subtilis</i>	LipM-LipL-LipA pathway Using octanoyl-ACP as a substrate, LipM catalyzes the formation of octanoyl-GcvH, then LipL transfers the octanoyl group to LD, lastly LipA catalyzes the formation of lipoyl-LD	LplJ-LipL pathway (1) LplJ catalyzes the formation of lipoyl-GcvH with free lipiolic acid, then LipL transfers the lipoyl group to LD (2) LplJ catalyzes the formation of lipoyl-LD of OGDH with free lipiolic acid, then LipL transfers the lipoyl group to LD of PDH and BKDH
<i>Staphylococcus aureus</i>	LipM-LipA-LipL pathway Using octanoyl-ACP as a substrate, LipM catalyzes the formation of octanoyl-GcvH, then LipA catalyzes the formation of lipoyl-GcvH, lastly LipL transfers lipoyl group to LD	LplA1/LplA2-LipL pathway (1) LplA1 catalyzes the formation of lipoyl- GcvH (or -GcvH-L) with free lipiolic acid, then LipL transfers the lipoyl group to LD (2) LplA2 catalyzes the formation of lipoyl- GcvH-L (or-LD), then LipL transfers the lipoyl group to LD
<i>Listeria monocytogenes</i>	No	LplA1/LplA2-LipL pathway LplA1 or LplA2 catalyzes the formation of lipoyl-GcvH with free lipiolic acid, then LipL transfers the lipoyl group to LD ScLplA
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Unknown	
Archaea		
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	Unknown	Ta LplA-Ta LplB LplA and LplB catalyze the formation of lipoyl-LD with free lipiolic acid
<i>Thermococcus kodakarensis</i>	LipB(LipM)-LipS1/LipS2 pathway Using octanoyl-ACP as a substrate, LipB (or LipM) catalyzes the formation of octanoyl-GcvH, then LipS1/LipS2 catalyze the formation of lipoyl-GcvH	Unknown
Others		
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Unknown	Lpl Lpl catalyzes the formation of lipoyl-GcvH with free lipiolic acid
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	LipB-LipA pathway Using octanoyl-ACP as a substrate, LipB catalyzes the formation of octanoyl-LD, then LipA catalyzes the formation of lipoyl-LD	No

G⁺: Gram positive bacteria; G⁻: Gram negative bacteria; LD: lipoyl domain of E2 subunit in α -oxo acid dehydrogenase; GcvH: the H protein in Glycine cleavage system; ACP: acyl carrier protein.

化途径中都发挥重要作用, 而硫辛酸补救合成途径中可能有多个 LplA 同源蛋白参与。古生菌中硫辛酰化途径研究报道较少, 其从头合成途径中关键的硫辛酸合成酶 LipS1/LipS2 在嗜热古生菌的基因组中较为广泛存在, 而许多嗜盐古生菌基因组编码 LipA 同源蛋白, 而古生菌硫辛酸补救合成途径中硫辛酸连接酶通常含有 LplA 和 LplB 两部分(异二聚体结构)。

硫辛酸作为细胞内重要的辅因子, 对细菌生长、致病性等方面具有广泛影响, 因此一些细菌不仅可以从头合成硫辛酸, 完成内源性硫辛酰化修饰, 还可编码硫辛酸酰胺酶获取环境中的非自由硫辛酸, 利用补救合成途径完成硫辛酰化修饰过程。但部分细菌只含有一种硫辛酰化途径。结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)中没有硫辛酸补救合成途径, 只能通过 LipB-LipA 途径从头合成硫辛酸, 因此 LipB 和 LipA 被认为是开发抗结核药物的理想靶标^[6,54]。植物病原菌野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)基因组编码同源性 XcLipB-XcLipA, 并催化硫辛酸从头合成, 但野油菜黄单胞菌中没有大肠杆菌硫辛酸连接酶 LplA 同源蛋白, 因此 *XclipA* 和 *XclipB* 都是必需基因, 只有在野油菜黄单胞菌中表达大肠杆菌 *lplA* 后才能获得 *XclipA* 或 *XclipB* 的敲除突变株, 而 *XclipA* 敲除突变株对寄主植物的致病力几乎完全丧失, 证明在只有硫辛酸从头合成途径的病原菌中, 硫辛酸合成酶 LipA 可能是良好的抗菌药物筛选靶点^[55]。与之类似, 在仅含有硫辛酸补救合成途径的细菌(如单增李斯特菌)中, 其硫辛酰化修饰过程的酶类是菌体生长所必需, 也可作为抗菌药物筛选的靶点^[50]。

由于硫辛酸在食品、化妆品和药物等方面都

具有非常高的经济价值, 但硫辛酸化学合成方法(己二酸法和环己酮法)都有步骤繁琐、工艺复杂且均采用化工原料污染环境等弊端, 因此如何利用生物法高效生产硫辛酸是当前的研究热点, 而对硫辛酸合成途径的研究可为获得高产硫辛酸的基因工程菌奠定基础^[56]。Sun 等根据大肠杆菌中硫辛酸从头合成途径, 在 *E. coli* BL21 中利用不同策略过量表达硫辛酸结构域 LipD、硫辛酸合成酶 LipA 和连接酶 LplA, 并添加辛酸作为硫辛酸合成前体, 结果显示基因工程菌中硫辛酸产量提高了 200 倍^[57]。利用不同来源的硫辛酸合成酶或连接酶催化活性差异, 可进一步在不同细胞体系中构建硫辛酸高产菌株, 为工业化应用提供可能性。

参考文献

- [1] Reed KE, Cronan JE. Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: sequencing and functional characterization of the *lipA* and *lipB* genes. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(5): 1325-1336.
- [2] Liao DF, Chen JW, Xie P, Zhu ZQ, Xu R. Studies on the antioxidation effects of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Journal of East China Normal University: Natural Science*, 2007(2): 87-92, 136. (in Chinese)
廖德丰, 陈季武, 谢萍, 朱振勤, 徐容. α -硫辛酸和二氢硫辛酸的抗氧化作用. 华东师范大学学报: 自然科学版, 2007(2): 87-92, 136.
- [3] Tajima K, Ikeda K, Chang HY, Chang CH, Yoneshiro T, Oguri Y, Jun H, Wu J, Ishihama Y, Kajimura S. Mitochondrial lipoylation integrates age-associated decline in brown fat thermogenesis. *Nature Metabolism*, 2019, 1(9): 886-898.
- [4] Liu Y, Wang EX, Pan CH, Dong XT, Ding MZ. Biosynthesis of α -lipoic acid in *Gluconobacter oxydans* increases the production of vitamin C by one-step fermentation. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(7): 1266-1276. (in Chinese)
刘宇, 王恩旭, 潘才惠, 董秀涛, 丁明珠. 氧化葡萄糖酸

- 杆菌中硫辛酸合成模块对维生素 C 一步混菌发酵的影响. *生物工程学报*, 2019, 35(7): 1266–1276.
- [5] Hayakawa S, Kawamura M, Sato T, Hirano T, Kikuchi T, Watanabe A, Fujimura S. An α -Lipoic acid derivative, and anti-ROS agent, prevents the acquisition of multi-drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2019, 25(1): 28–33.
- [6] Lanz ND, Lee KH, Horstmann AK, Pandelia ME, Cicchillo RM, Krebs C, Booker SJ. Characterization of lipoyl synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, 2016, 55(9): 1372–1383.
- [7] Cronan JE. Advances in synthesis of biotin and assembly of lipoic acid. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2018, 47: 60–66.
- [8] Cronan JE. Assembly of lipoic acid on its cognate enzymes: an extraordinary and essential biosynthetic pathway. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2016, 80(2): 429–450.
- [9] Spalding MD, Prigge ST. Lipoic acid metabolism in microbial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, 74(2): 200–228.
- [10] Cronan JE. Progress in the enzymology of the mitochondrial diseases of lipoic acid requiring enzymes. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 510. DOI:10.3389/fgene.2020.00510.
- [11] Perham RN. Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions. *Annual Review of Biochemistry*, 2000, 69: 961–1004.
- [12] Perham RN. Domains, motifs, and linkers in 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes: a paradigm in the design of a multifunctional protein. *Biochemistry*, 1991, 30(35): 8501–8512.
- [13] Cronan JE. Biotin and lipoic acid: synthesis, attachment, and regulation. *EcoSal Plus*, 2008, 3(1): 10.1128. DOI:10.1128/ecosalplus.3.6.3.5.
- [14] Tezuka T, Ohnishi Y. Two *Glycine* riboswitches activate the *Glycine* cleavage system essential for *Glycine* detoxification in *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(7): 1369–1376.
- [15] Reed LJ, Hackert ML. Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(16): 8971–8974.
- [16] Ricaud PM, Howard MJ, Roberts EL, Broadhurst RW, Perham RN. Three-dimensional structure of the lipoyl domain from the dihydrolipoyl succinyltransferase component of the 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 264(1): 179–190.
- [17] Zhao X, Miller JR, Cronan JE. The reaction of LipB, the octanoyl-[acyl carrier protein]: protein N-octanoyltransferase of lipoic acid synthesis, proceeds through an acyl-enzyme intermediate. *Biochemistry*, 2005, 44(50): 16737–16746.
- [18] Ali ST, Moir AJG, Ashton PR, Engel PC, Guest JR. Octanoylation of the lipoyl domains of the pyruvate dehydrogenase complex in a lipoyl-deficient strain of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 1990, 4(6): 943–950.
- [19] Cao XY, Zhu L, Song XJ, Hu Z, Cronan JE. Protein moonlighting elucidates the essential human pathway catalyzing lipoic acid assembly on its cognate enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2018, 115(30): E7063–E7072.
- [20] Martin N, Christensen QH, Mansilla MC, Cronan JE, de Mendoza D. A novel two-gene requirement for the octanoyltransfer reaction of *Bacillus subtilis* lipoic acid biosynthesis. *Molecular Microbiology*, 2011, 80(2): 335–349.
- [21] Cao XY, Hong YQ, Zhu L, Hu YY, Cronan JE. Development and retention of a primordial moonlighting pathway of protein modification in the absence of selection presents a puzzle. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2018, 115(4): 647–655.
- [22] Jordan SW, Cronan JE Jr. The *Escherichia coli* lipB gene encodes lipoyl (octanoyl)-acyl carrier protein: protein transferase. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(5): 1582–1589.
- [23] Cronan JE. The structure of lipoyl synthase, a remarkable enzyme that performs the last step of an extraordinary biosynthetic pathway. *Biochemical Journal*, 2014, 464(1): e1–e3. DOI:10.1042/bj20141061.
- [24] Morris TW, Reed KE, Cronan JE. Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: the lipA and lipB genes define redundant pathways for ligation of lipoyl groups to apoprotein. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(1): 1–10.

- [25] Kim DJ, Lee SJ, Kim HS, Kim KH, Lee HH, Yoon HJ, Suh SW. Structural basis of octanoic acid recognition by lipoate-protein ligase B. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2008, 70(4): 1620–1625.
- [26] Harmer JE, Hiscox MJ, Dinis PC, Fox SJ, Iliopoulos A, Hussey JE, Sandy J, van Beek FT, Essex JW, Roach PL. Structures of lipoyl synthase reveal a compact active site for controlling sequential sulfur insertion reactions. *The Biochemical Journal*, 2014, 464(1): 123–133.
- [27] McLaughlin MI, Lanz ND, Goldman PJ, Lee KH, Booker SJ, Drennan CL. Crystallographic snapshots of sulfur insertion by lipoyl synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2016, 113(34): 9446–9450.
- [28] Lanz ND, Rectenwald JM, Wang B, Kakar ES, Laremore TN, Booker SJ, Silakov A. Characterization of a radical intermediate in lipoyl cofactor biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(41): 13216–13219.
- [29] McCarthy EL, Booker SJ. Destruction and reformation of an iron-sulfur cluster during catalysis by lipoyl synthase. *Science*, 2017, 358(6361): 373–377.
- [30] Dong G, Cao LL, Ryde U. Insight into the reaction mechanism of lipoyl synthase: a QM/MM study. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2018, 23(2): 221–229.
- [31] McCarthy EL, Booker SJ. Biochemical approaches for understanding iron-sulfur cluster regeneration in *Escherichia coli* lipoyl synthase during catalysis. *Methods in Enzymology*, 2018, 606: 217–239.
- [32] McCarthy EL, Rankin AN, Dill ZR, Booker SJ. The A-type domain in *Escherichia coli* NfuA is required for regenerating the auxiliary[4Fe-4S]cluster in *Escherichia coli* lipoyl synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(5): 1609–1617.
- [33] Kim DJ, Kim KH, Lee HH, Lee SJ, Ha JY, Yoon HJ, Suh SW. Crystal structure of lipoate-protein ligase A bound with the activated intermediate: insights into interaction with lipoyl domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(45): 38081–38089.
- [34] Fujiwara K, Toma S, Okamura-Ikeda K, Motokawa Y, Nakagawa A, Taniguchi H. Crystal structure of lipoate-protein ligase A from *Escherichia coli*: Determination of the lipoic acid-binding site. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(39): 33645–33651.
- [35] Cronan JE, Zhao X, Jiang YF. Function, attachment and synthesis of lipoic acid in *Escherichia coli*. *Advances in Microbial Physiology*, 2005, 50: 103–146.
- [36] McManus E, Luisi BF, Perham RN. Structure of a putative lipoate protein ligase from *Thermoplasma acidophilum* and the mechanism of target selection for post-translational modification. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 356(3): 625–637.
- [37] Martin N, Lombardía E, Altabe SG, de Mendoza D, Mansilla MC. A lipA (yutB) mutant, encoding lipoic acid synthase, provides insight into the interplay between branched-chain and unsaturated fatty acid biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(24): 7447–7455.
- [38] Christensen QH, Cronan JE. Lipoic acid synthesis: a new family of octanoyltransferases generally annotated as lipoate protein ligases. *Biochemistry*, 2010, 49(46): 10024–10036.
- [39] Christensen QH, Martin N, Mansilla MC, de Mendoza D, Cronan JE. A novel amidotransferase required for lipoic acid cofactor assembly in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 2011, 80(2): 350–363.
- [40] Zorzoli A, Grayczyk JP, Alonzo F. *Staphylococcus aureus* tissue infection during Sepsis is supported by differential use of bacterial or host-derived lipoic acid. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(10): e1005933.
- [41] Laczkovich I, Teoh WP, Flury S, Grayczyk JP, Zorzoli A, Alonzo III F. Increased flexibility in the use of exogenous lipoic acid by *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 2018, 109(2): 150–168.
- [42] Grayczyk JP, Harvey CJ, Laczkovich I, Alonzo F III. A lipoylated metabolic protein released by *Staphylococcus aureus* suppresses macrophage activation. *Cell Host & Microbe*, 2017, 22(5): 678–687.e9.
- [43] Jin JQ, Hachisuka SI, Sato T, Fujiwara T, Atomi H. A structurally novel lipoyl synthase in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(23): e01359–01320.
- [44] Christensen QH, Hagar JA, O'Riordan MXD, Cronan JE. A complex lipoate utilization pathway in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(36): 31447–31456.
- [45] Jiang YF, Cronan JE. Expression cloning and demonstration of *Enterococcus faecalis* lipoamidase (pyruvate dehydrogenase

- inactivase) as a Ser-Ser-Lys triad amidohydrolase. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(3): 2244–2256.
- [46] Rasetto NB, Lavatelli A, Martin N, Mansilla MC. Unravelling the lipoyl-relay of exogenous lipoate utilization in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 2019, 112(1): 302–316.
- [47] Christensen QH, Cronan JE. The *Thermoplasma acidophilum* LplA-LplB complex defines a new class of bipartite lipoate-protein ligases. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(32): 21317–21326.
- [48] Posner MG, Upadhyay A, Bagby S, Hough DW, Danson MJ. A unique lipoylation system in the Archaea. *FEBS Journal*, 2009, 276(15): 4012–4022.
- [49] Cao XY, Cronan JE. The *Streptomyces coelicolor* lipoate-protein ligase is a circularly permuted version of the *Escherichia coli* enzyme composed of discrete interacting domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(11): 7280–7290.
- [50] Keeney KM, Stuckey JA, O’Riordan MXD. LplA1-dependent utilization of host lipoyl peptides enables *Listeria* cytosolic growth and virulence. *Molecular Microbiology*, 2007, 66(3): 758–770.
- [51] Grayczyk JP, Alonzo F III. *Staphylococcus aureus* Lipoic acid synthesis limits macrophage reactive oxygen and nitrogen species production to promote survival during infection. *Infection and Immunity*, 2019, 87(10): e00344–19.
- [52] Teoh WP, Resko ZJ, Flury S, Alonzo F III. Dynamic relay of protein-bound lipoic acid in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 2019, 201(22): e00446–19.
- [53] Zhu KM, Chen H, Jin J, Wang N, Ma GX, Huang JD, Feng YJ, Xin JQ, Zhang HM, Liu HG. Functional identification and structural analysis of a new lipoate protein ligase in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 156.
- [54] Ma Q, Zhao X, Eddine AN, Geerlof A, Li X, Cronan JE, Kaufmann SHE, Wilmanns M. The *Mycobacterium tuberculosis* LipB enzyme functions as a cysteine/lysine dyad acyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2006, 103(23): 8662–8667.
- [55] Ma JR, Liu AN, Zhang WB, Mao YH, Yu YH. LipB-LipA is the only lipoyl acylation pathway in *Xanthomonas campestris*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(8): 1729–1740. (in Chinese)
马建荣, 刘安娜, 张文彬, 毛雅慧, 余永红. 野油菜黄单胞菌中 LipB-LipA 是唯一的硫辛酰化途径. *微生物学报*, 2020, 60(8): 1729–1740.
- [56] 陶乃敏. 硫辛酸合成的工艺研究. 天津大学硕士学位论文, 2014.
- [57] Sun YR, Zhang WB, Ma JC, Pang HS, Wang HH. Overproduction of α -lipoic acid by gene manipulated *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 2017, 12(1): e0169369.

Advances in protein lipoylation pathways in bacteria

Jianrong Ma¹, Yonghong Yu^{1*}, Yicai Chen², Mingfeng Yan², Wenbin Zhang²

¹ Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, Guangdong Province, China

² Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China

Abstract: Lipoic acid is a derivative of octanoic acid with two sulfur atoms at carbon atoms 6 and 8. The strong antioxidant activity of lipoic acid makes it have a good application prospect in the fields of health food, cosmetics and medicine. Lipoic acid as an important cofactor is required for several key enzymes complexes, like α -ketoacid dehydrogenase, and it also involves in energy generation and intermediate metabolisms. The protein lipoylation pathways have been well studied in the model organism *Escherichia coli*, including the lipoic acid *de novo* synthetic pathway dependent on LipB-LipA and the lipoic acid salvage pathway dependent on LplA. However, the lipoylation pathways in different bacteria show a highly diversity. The GcvH protein in certain bacteria also participates in protein lipoylation eventhough the related enzymes are different. In this review, we comprehensively discussed the current research progress on lipoic acid dependent multiple enzyme complexes, the lipoyl domain, GcvH proteins, as well as the protein lipoylation pathways in differen bacteria, aiming to provide theoretical support for further understanding the protein lipoylation in bacteria, developing the targeted antibacterial drugs, and efficient lipoic acid production with biological methods.

Keywords: lipoic acid, lipoic acid *de novo* synthetic pathway, lipoic acid salvage pathway

(本文责编: 李磊)

Supported by the Guangzhou Science and Technology Plan Project (202002030422), by the National Natural Science Foundation of China (31601601), by the Science Foundation of Guangdong Food & Drug Vocational College (2019ZR13, 2019ZR17, 2020ZR03), by the Special Fund for Scientific and Technological Innovation Cultivation of Guangdong University Students (Climbing Plan) (pdjh2020b1010) and by the Open Research of Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms (PFRAO201804)

*Corresponding author. Tel: +86-20-28194616; E-mail: yuyh@gdyzy.edu.cn

Received: 29 September 2020; Revised: 16 January 2021; Published online: 29 July 2021