

光滑球拟酵母中 α -酮戊二酸脱氢酶系生理作用解析

张旦旦², 刘立明^{1,2*}, 堵国成², 陈坚^{1,2}

(¹江南大学; 食品科学与技术国家重点实验室; ²工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122)

摘要:【目的】研究 α -酮戊二酸脱氢酶系在光滑球拟酵母碳代谢流、能量代谢和氨基酸代谢中的生理作用。

【方法】通过敲除光滑球拟酵母中编码 α -酮戊二酸脱氢酶系中 E1 酶的基因 *kgd1* 构建 α -酮戊二酸脱氢酶活性缺失菌株 *T. glabrata kgd1::kan*, 并考察 KGDH 缺失引起 TCA 循环关键酶活性、碳代谢流量以及胞内氨基酸和能荷水平等方面的变化。【结果】光滑球拟酵母中 α -酮戊二酸脱氢酶活性的缺失导致: (1) 细胞启动乙醛酸途径, 通过形成 TCA-乙醛酸循环实现 TCA 循环的正常代谢; (2) 胞内 NADH/NAD⁺ 水平下降 33.7%, ATP/ADP 水平下降 31.8%, 而与 NADH 代谢相关的丙酮酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶的活性分别提高 58.1%、33.3% 和 32.5%; (3) 胞内丙酮酸含量下降 50.1%, 而胞内琥珀酸、苹果酸和 α -酮戊二酸含量则分别增加了 172.7%、66.1% 和 41.1%; (4) 丙酮酸族氨基酸含量下降 29.3%, 而胞内谷氨酸族氨基酸和天冬氨酸族氨基酸含量则提高了 34.7% 和 26.8%。【结论】上述研究结果表明, α -酮戊二酸脱氢酶系在微生物细胞中心碳代谢、能量代谢和氨基酸代谢中发挥着重要作用。

关键词: α -酮戊二酸脱氢酶系; 光滑球拟酵母; α -酮戊二酸; 丙酮酸

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2009) 12-1584-06

α -酮酸脱氢酶系 (α -keto acid dehydrogenase complex, KDC) 作为微生物细胞中 α -酮酸代谢的关键酶, 催化 α -酮酸氧化脱羧生成酰辅酶 A 的同时生成 NADH。 α -酮酸脱氢酶系底物 α -酮酸以及产物酰辅酶 A 和 NADH 均为微生物细胞中重要的节点代谢物, 在碳代谢、氨基酸代谢和能量代谢中发挥着关键作用。KDC 是由 3 个不同酶所组成的复合酶系 (图 1), 其中, E1 为 α -酮酸脱羧酶, 完成对 α -酮酸的脱羧反应, 同时生成羟乙基硫胺素二磷酸; E2 为硫辛酸酰基转移酶, 将 E1 反应的产物与硫辛酸反应形成酰基二氢硫辛酸, 酰基被转移至 CoA, 生成酰-CoA; E3 为硫辛酰胺脱氢酶, 氧化二氢硫辛酸, 并通过 FAD 将氢传递到 NAD⁺, 生成 NADH, 同时完成酶系的循环反应^[1-2]。在三羧酸循环中有两个关键酶

系——丙酮酸脱氢酶系 (pyruvate dehydrogenase complex, PDH) 和 α -酮戊二酸脱氢酶系 (α -ketoglutarate dehydrogenase complex, KGDH) 属于 KDC。前期研究中, Wenzel^[3-4] 等发现过量表达编码 PDH-E1 α 亚基的基因 *pda1* 能有效地提高 PDH 表达活性。在利用酿酒酵母发酵生产琥珀酸的过程中发现, 敲除编码 KGDH-E1 酶的基因 *kgd1* 能有效地促进琥珀酸的积累^[5-6]。上述研究结果表明, 酵母细胞中 KDC 的活性由其中以 α -酮酸为直接底物的 E1 酶所调控。

为了进一步阐释酵母细胞中 KDC 的生理功能, 以能同时发酵生产两种 α -酮酸 (丙酮酸和 α -酮戊二酸) 的双核酵母细胞光滑球拟酵母为研究菌株, 以 KGDH 为研究模型, 通过敲除编码 KGDH-E1 酶的基

基金项目: 国家杰出青年基金 (Q0625619); 国家“863 计划” (Q006AA02Z201); 国家自然科学基金 (30670066, 20706025)

* 通信作者。Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: lingli@jiangnan.edu.cn, jchen@jiangnan.edu.cn

作者简介: 张旦旦 (1984-), 女, 浙江台州人, 硕士研究生, 研究方向为分子生物学。E-mail: zhangdd.1123@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-05-20; 修回日期: 2009-06-21

因 *kgd1* 构建 KGDH 活性缺失菌株,研究 KGDH 在酵母细胞碳源、能量和氨基酸代谢中的生理作用,为

调控三羧酸循环代谢及其产物的高效生产奠定理论基础。

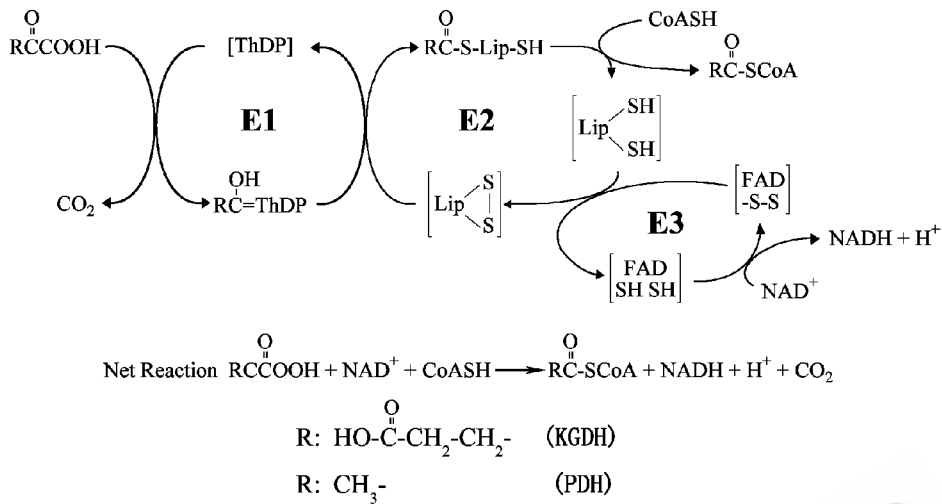


图1 α -酮酸脱氢酶系反应体系

Fig.1 The reaction pathway of α -keto acid dehydrogenase.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒:光滑球拟酵母 (*Torulopsis glabrata*) CCTCC M202019,烟酸、生物素、硫胺素、盐酸吡哆醇4种维生素营养缺陷型菌株,且丙酮酸脱氢酶活性组成型降低,为本实验室保藏。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 由本实验室保藏。穿梭质粒 pUG6 同时含有 *amp^r* 和 *kan^r* 两种抗性基因,前者在大肠杆菌中表达 Amp 抗性,后者大肠杆菌中表达 Kan 抗性,而在酵母中表达 G418 抗性。载体 pMD19T simple vector 用于敲除质粒的构建,购于 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要试剂:限制性内切酶、T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、Ex-Taq DNA 聚合酶、dATP、dGTP、dCTP、dTTP 等购自 TaKaRa 公司,质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒、抗生素等购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.1.3 培养基及培养条件:①LBAK 培养基:LB 培养基在使用前加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素 (Amp) 和 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素 (Kan)。②YPD 培养基:葡萄糖 20 g,蛋白胨 20 g,酵母粉 10 g,蒸馏水定容至 1L。需要时使用前加入 1 mg/mL G418 (YPG 培养基),固体培养基添加 20 g 琼脂,用于目的菌的筛选。③LB 培养基、种子及发酵培养基、培养条件参见文献^[7],发酵时间为 72 h。

1.2 目的基因克隆与敲除质粒的构建

引物序列如表 1 所示。以 *T. glabrata* 总 DNA 为模板,L1/R1 为引物,PCR 得到 3.5 kb 的目的片段 *kgd1*。以质粒 pUG6 为模板,L3/R3 为引物,PCR 扩增得到两端含 *EcoR* I 酶切位点的 1.7 kb 的抗性片段 *kan*。PCR 反应采用 50 μL 体系,PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ (*kgd1*:4 min;*kan*:90 s) 30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。经 1% 琼脂糖凝胶电泳后回收 PCR 扩增产物。

表 1 引物

Table 1 Primers

PCR fragment	Primer name	Sequence (5'→3')	Restriction sites
<i>kgd1</i>	L1	CGGGGTATAAATACTGGACG	
	R1	TCATCAGTCATCTCGGAGTC	
<i>kgd2</i>	L2	TCACCTATGTTTCGCTC	
	R2	AACCGACAAGTTAGGAGT	
<i>kan</i>	L3	CCGAATTCACAGCTGAAGCTTCGTACCG	<i>EcoR</i> I
	R3	GCGAATTCAGAGCGGAGGAAGCGGAAGAGC	<i>EcoR</i> I

将回收的 PCR 产物 *kgd1* 克隆至 pMD19-T simple 载体上,得到质粒 pMD-*kgd1*。将该质粒和 PCR 产物 *kan* 片段用 *EcoR* I 酶切消化后连接,并转化宿主菌 JM109 感受态细胞,在 LBAK 平板上选择 Amp 和 Kan 双抗性克隆子,酶切鉴定后,送上海生工测序验证。

1.3 重组目的菌 *T. glabrata kgd1::kan* 的构建和验证

以重组质粒 pMD-*kgd1::kan* 为模板,L1/R1 为引物 PCR 得到敲除组件 *Kgd1::Kan*,转化酵母 *T.*

glabrata 得到目的菌 *T. glabrata* *kgd1*:*kan*。

转化和筛选操作流程参照 Invitrogen 公司的毕赤表达操作手册并进行部分修改。取 80 μ L 感受态细胞,加入 5~10 μ L 敲除组件 *Kgd1*:*kan*,混合后转移至预冷的 0.2 cm 电击杯中,置电击仪中电击转化。电击结束后立即加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 的山梨醇,混匀后,培养 1~2 min,以每板 100 μ L 菌液涂布于固体 YPG 平板,30 $^{\circ}$ C 培养,选择 G418 抗性转化子。

1.4 分析与测定

胞内 ATP/ADP 含量测定参见文献^[8-9]。NADH 和 NAD⁺ 的测定参见文献^[10-11]。KGDH、PDH、异柠檬酸裂解酶 (Isocitrate Lyase, ICL)、异柠檬酸脱氢酶 (Isocitrate dehydrogenase, ICDH)、苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase, MDH) 酶活测定方法参见文献^[12-16]。蛋白质含量采用 Bradford 法测定,以牛血清蛋白为标准蛋白^[17]。葡萄糖、有机酸、细胞浓度 (Dry Cell Weight, DCW) 测定具体操作参见文献^[18]。

2 结果

2.1 敲除组件的构建和重组菌的筛选验证

以 *T. glabrata* 总 DNA 为模板,PCR 扩增得到

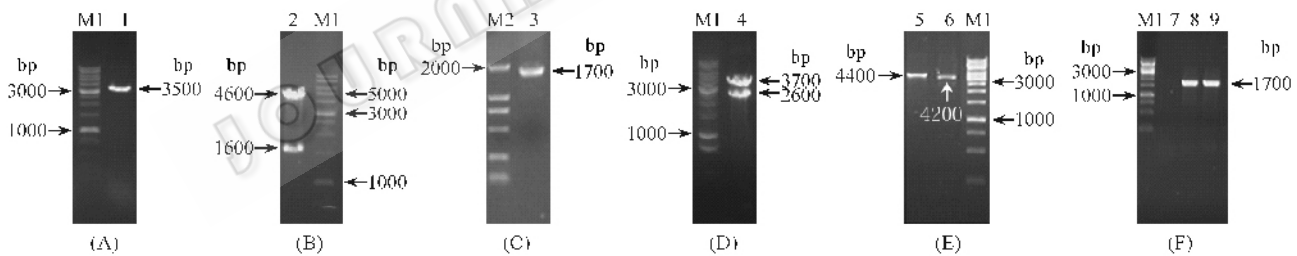


图2 目的基因的扩增、敲除质粒的构建和重组菌的筛选验证

Fig.2 Analysis of genes and plasmids, screen of mutant strain. M1. 1kb ladder; M2. DL2000 markers; 1. *kgd1*; 2. pMD-*kgd1*/*EcoR* I; 3. *kan*; 4. pMD-*kgd1*:*kan*/*Pst* I; 5~9 use the DNA followed as template: 5. mutant strain; 6. parent strain; 7. purified 6; 8. pUG6; 9. purified 5.

2.2 KGDH 对胞内核苷酸类物质代谢的影响

如图 3 所示, TCA 循环中与 NADH 代谢相关的表 2 胞内能荷水平的变化

Table 2 The changes of the intracellular nucleotide pool

Parameters	Strains		Change (B/A-1)* 100%
	Parent (A)	Mutant (B)	
NAD ⁺ (μ mol/g DCW)	10.00	11.16	11.6%
NADH (μ mol/g DCW)	5.63	4.17	-25.9%
NADH/NAD ⁺	0.56	0.37	-33.9%
ADP (μ mol/g DCW)	52.01	44.11	-15.2%
ATP (μ mol/g DCW)	115.52	66.81	-42.2%
ATP/ADP	2.22	1.51	32.0%

3.5 kb 的目的片段 *kgd1* (图 2-A), 克隆至 pMD19T simple 载体中, 得到质粒 pMD-*kgd1*, 该质粒经 *EcoR* I 酶切消化, 得到 1.6 kb 和 4.6 kb 的片段 (图 2-B), 其中 1.6 kb 为 *kgd1* 基因的一部分, 4.6 kb 为含有 *kgd1* 基因左右臂且带有 *EcoR* I 消化末端的载体 pMD19, 命名为 pMD-LR。

以质粒 pUG6 为模板, PCR 扩增得到两端带有 *EcoR* I 位点的长为 1.7 kb 的卡那霉素抗性基因 (*kan*^r) 片段 (图 2-C)。该片段经限制性内切酶 *EcoR* I 酶切消化后, 浓缩纯化, 克隆到载体 pMD-LR 中, 得到重组质粒 pMD-*kgd1*:*kan* (质粒 *Pst* I 酶切验证如图 2-D) 并经测序验证。

以重组质粒 pMD-*kgd1*:*kan* 为模板, L1/R1 为引物 PCR 得到敲除组件 *Kgd1*:*kan*, 电击转化感受态 *T. glabrata*, 由于敲除组件上带有 *kan*^r 基因, 在酵母中表达 G418 抗性, 得到能在 YPG 培养基上正常生长的突变株。

验证步骤如下: (1) 以突变株总 DNA 为模板, 以 L2/R2 为引物, PCR 得到 4.4 kb 的片段 *Kgd2* (原菌 PCR 产物为 4.2 kb) (图 2-E); (2) 以 *Kgd2* 为模板, 以 L3/R3 为引物验证抗性, 得到 1.7 kb 的 *kan* 片段 (图 2-F), 即为目的菌。筛选得到的目的菌经验证传 10 代得到稳定遗传的重组菌 *T. glabrata* *kgd1*:*kan*。

酶主要是异柠檬酸脱氢酶 (ICDH)、 α -酮戊二酸脱氢酶 (KGDH) 和苹果酸脱氢酶 (MDH)。 *kgd1* 基因的敲除导致胞内 NADH 含量下降了 25.9%, 相应地, NADH/NAD 水平下降了 33.9%。胞内 ATP/ADP 水平下降了 32.0% (表 2)。

2.3 KGDH 对 TCA 循环关键酶活性的影响

由于 *kgd1* 缺陷和能荷水平下降导致的 TCA 循环关键酶活性的变化如图 3 所示, KGDH 活性几乎丧失 (仅为对照的 4%)。而 ICL 活性增加了 70.7%, 表明在 KGDH 途径受阻的情况下, 细胞为了维持正常的碳代谢, 选择增加乙醛酸途径作为补充

途径,通过 TCA-乙醛酸循环实现碳的代谢。同时,由于胞内 NADH 含量的下降导致 TCA 循环中与

NADH 代谢相关的酶 PDH、ICDH 和 MDH 的活性分别提高了 58.1%、33.3%和 32.5%。

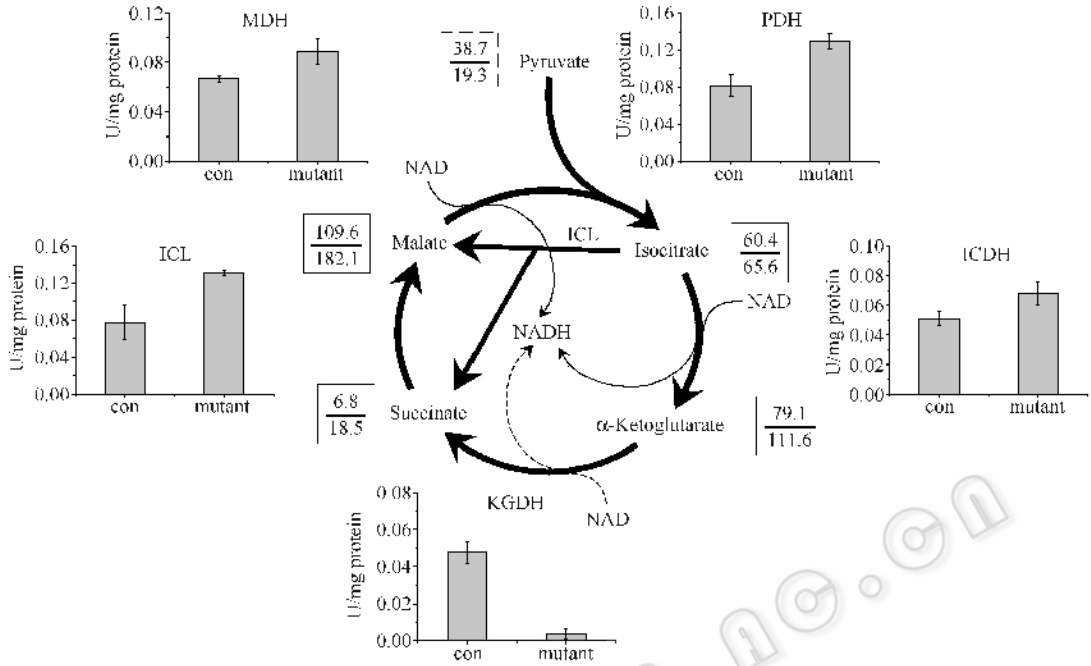


图 3 TCA-乙醛酸循环途径酶活及有机酸变化

Fig.3 Changes of enzymes and organic acid in TCA-Glyoxalate cycle

2.4 KGDH 对碳流量及流向与氨基酸代谢的影响

如图 3 所示,PDH 活性增加导致胞内丙酮酸含量下降了 50.1%,进入 TCA-乙醛酸循环的碳流量增加,琥珀酸和苹果酸的胞内含量分别增加了 172.1%和 66.1%,同时胞内 α -酮戊二酸水平提高了

41.1%。这一结果进一步证明 TCA-乙醛酸循环通量增加。胞内氨基酸水平变化如图 4 所示,随着丙酮酸含量的下降,丙酮酸族氨基酸含量下降了 29.3%。而 α -酮戊二酸和草酰乙酸含量增加使得胞内谷氨酸族氨基酸和天冬氨酸族氨基酸含量分别提高了 34.6%和 26.8% (表 3)。

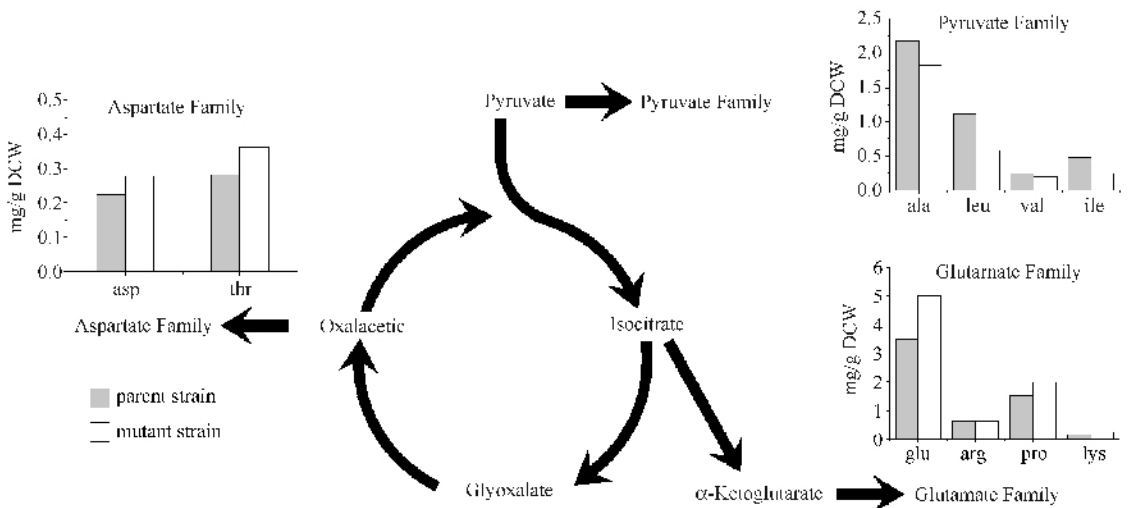


图 4 胞内氨基酸变化

Fig.4 Changes of intracellular amino acid pool

表 3 胞内氨基酸库水平变化

Table 3 Effect of KGDH on the intracellular amino acid pool

Parameters mg/g DCW	Strains		Change (B/A - 1) * 100%
	Parent (A)	Mutant (B)	
Glutamate Family	5.81	7.82	34.6%
Aspartate Family	0.50	0.64	28%
Pyruvate Family	3.99	2.82	-29.3%

3 讨论

本研究通过敲除 α -酮戊二酸脱氢酶系 *kgd1* 基因,研究工程菌碳主流代谢途径中关键酶活性变化,以及碳代谢、氨基酸代谢和能量代谢的变化。在本研究中,*kgd1* 基因的敲除阻断了碳代谢流通过 KGDH 节点的进一步代谢,同时 ICL 活性增加 70.7%,说明在 KGDH 途径受阻的情况下,乙醛酸循环成为碳主流代谢途径,在 *T. glabrata* 中形成 TCA-乙醛酸循环。另一方面,由于 KGDH 途径缺失, NADH 来源减少,导致胞内能荷水平下降,而 TCA-乙醛酸循环通量增加,碳代谢流从丙酮酸节点导入 TCA 循环,丙酮酸含量减少,而 TCA 循环中代谢物(包括琥珀酸、苹果酸、异柠檬酸、 α -酮戊二酸等)的合成均有一定程度的提高。这也推动了 α -酮戊二酸通过谷氨酸途径的进一步代谢,导致谷氨酸族氨基酸含量的提高。

参考文献

[1] Li L, Thipyapong P, Breeden DC, et al. Over expression of a bacterial branched-chain-keto acid dehydrogenase complex in *Arabidopsis* results in accumulation of branched-chain acyl-CoAs and alteration of free amino acid composition in seeds. *Plant Science*, 2003, 165: 1213 - 1219.

[2] Singh VK, Hattangady DS, Giotis ES, et al. Insertional inactivation of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase in *Staphylococcus aureus* leads to decreased branched-chain membrane fatty acid content and increased susceptibility to certain stresses. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (19): 5882 - 5890.

[3] Wenzel TJ, Luttk MA, Berg JA, et al. Regulation of the PDA1 gene encoding the E1 alpha subunit of the pyruvate dehydrogenase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 218 (2): 405 - 411.

[4] Zeeman AM, Kuyper M, Pronk JT, et al. Regulation of pyruvate metabolism in chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. *Yeast*, 2000, 16 (7): 611 - 620.

[5] Camarasa C, Grivet JP, Dequin S. Investigation by ^{13}C -NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology*, 2003, 149 (9): 2669 - 2678.

[6] Arikawa Y, Kuroyanagi T, Shimosaka M, et al. Effect of gene disruptions of the TCA cycle on production of succinic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 87 (1): 28 - 36.

[7] 梁楠, 刘立明, 王森等. 提高光滑球拟酵母乙酰辅酶 A 水平促进 α -酮戊二酸合成. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48 (7): 874 - 878.

[8] Sato K, Yoshida Y, Hirahara T, and et al. On-line measurement of intracellular ATP of *Saccharomyces cerevisiae* and pyruvate during sake mashing. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 90: 294 - 301.

[9] Miseta A, Tokes-Fuzesi M, Aiello D, et al. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant unable to convert glucose to glucose-6-phosphate accumulates excessive glucose in the endoplasmic reticulum due to core oligosaccharide trimming. *Eukaryotic Cell*, 2003, 2: 534 - 541.

[10] Vemuri GN, Altman E, Sangurdekar DP, et al. Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (5): 3653 - 3661.

[11] Miseta A, Tokes-Fuzesi M, Aiello D, et al. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant unable to convert glucose to glucose-6-phosphate accumulates excessive glucose in the endoplasmic reticulum due to core oligosaccharide trimming. *Eukaryotic Cell*, 2003, 2: 534 - 541.

[12] Reed LJ and Mukherjee BB. α -Ketoglutarate dehydrogenase complex from *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology*, 1969, 13: 55 - 61.

[13] 何亚辉, 姜英, 袁均林等. 丙酮酸脱氢酶测活方法比较研究. *化学与生物工程 (Chemistry and Bioengineering)*, 2006, 23 (8): 27 - 30.

[14] Cook RA and Sanwal BD. Isocitrate dehydrogenase (NAD-specific) from *Neurospora crassa*. *Methods in Enzymology*, 1969, 13: 42 - 47.

[15] McFadden BA. Isocitrate lyase. *Methods in Enzymology*, 1969, 13: 163 - 170.

[16] Murphey WH, Kitto GB. Malate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology*, 1969, 13: 145 - 147.

[17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248 - 254.

[18] 刘立明,李寅,陈坚.一种基于途径分析提高丙酮酸产量的育种策略.微生物学报 (*Acta Microbiologica*

Sinica), 2005, 45 (2): 77-80.

Physiological function of α -ketoglutarate dehydrogenase complex in *Torulopsis glabrata*

Dandan Zhang², Liming Liu^{1,2*}, Guocheng Du², Jian Chen^{1,2}

(¹ State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, ²The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [Objective] We studied the physiological function of α -ketoglutarate dehydrogenase complex (KGDH) on the metabolism of *Torulopsis glabrata*. [Methods] With manipulation of KGDH in *Torulopsis glabrata*, we screened a mutant strain *T. glabrata kgd1::kan*, in which the *kgd1* gene encoding the E1 subunit of KGDH was deleted. [Results] Disruption of KGDH resulted in: (a) the enhancement of glyoxalate pathway as a complementarity for carbon metabolism in TCA cycle; (b) compared with that of the control, the ratio of NADH/NAD⁺ and ATP/ADP decreased by 33.7% and 31.8%, respectively. But the specific activities of pyruvate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase and malate dehydrogenase increased by 58.1%, 33.3% and 32.5%, respectively; (c) the intracellular concentration of pyruvate was reduced by 49.9%, while the intracellular concentration of succinate, malate and α -ketoglutarate was higher 172.7%, 66.1% and 41.1% than the corresponding values of the control; (d) The content of pyruvate-family amino acid was 29.3% lower while the level of glutamate-family amino acid and aspartate-family amino acid were 34.7% and 26.8% higher than that of control. [Conclusions] Those results present here demonstrated that α -ketoglutarate dehydrogenase complex plays essential role on the metabolism of yeast.

Keywords: α -ketoglutarate dehydrogenase complex; *Torulopsis glabrata*; α -ketoglutarate; pyruvate

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Outstanding Youth Foundation of China (20625619), the National Natural Science Foundation of China (30670066, 20706025) and the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA02Z201)

* Corresponding author. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: mingli@jiangnan.edu.cn, jchen@jiangnan.edu.cn

Received 20 May 2009/Revised: 21 June 2009

《微生物学报》审稿程序

问:贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答:本刊严格遵守“三审制”,即编辑部内审,专家外审,主编总审。我们的承诺是,从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,5~7个月之内发表。

- (1) 收到来稿后,首先将请2位专家进行初审,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。在此提醒作者,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。