



ACV 合成酶生物合成和作用的调节

张劲游 A. L. Demain

(美国麻省理工学院生物系, 波士顿)

头孢菌素生物合成的研究已经历了30年。非细胞体系的研究, 起初是用合成途径中后期的酶, 近年来, 转向研究合成途径中早期的酶。其中, 第一个酶 δ -(L- α -氨基己二酰)-L-半胱氨酸-D-缬氨酸 (ACV) 合成酶, 在非细胞抽出液中是最难确证的酶之一。最近, 我们从顶头孢霉 (*Cephalosporium acremonium*) 建立了一个可重复的体系^[1], 而在棒状链霉菌 (*Streptomyces clavuligerus*) 中也发现了相似的活性^[2]。用该测定法, 我们已研究了 ACV 合成酶形成和作用的调节, 本文对其结果作一简要介绍。

我们用顶头孢霉 C-10 和棒状链霉菌 NRRL 3585 对 β -内酰胺几种合成酶的胞内比活性作了比较(表 1), 结果指出 ACV 合成酶的活性最低, 说明是头孢菌素生物合成过程中的速率限制步骤。因为它是青霉素和头孢菌素共有的生物合成途径的起始酶(图 1), 故从细胞生理的观点, 有其特殊的意义, 为什么 ACV 合成酶比其它步骤更具调控作用的原因, 也就可以理解了。

(一) 碳源调节

易于利用的碳源, 如葡萄糖早已知道对 β -内酰胺生物合成起着负的作用^[3,4]。已有报道葡萄糖干扰 ACV 的形成。Martin 研究组^[5]用产黄青霉菌 (*Penicillium chrysogenum*) AS-P-78 限制氮源的静止细胞作试验, 发现葡萄糖显著降低 [C^{14}] 缬氨酸渗入 ACV。此后, 该研究组^[6]指出青霉素生物合成受葡萄糖全阻遏的条件下, 不形成 ACV; 当葡萄糖的含量减少时, 出现三肽生物合成去阻遏现象。Cortes 等^[7,8]观察诺卡氏菌 (*Nocardia lactamdurans*) 一菌株的生长, 发现葡萄糖存在, 显著降低 ACV 的形成, 这一结果与葡萄糖对扩环酶 (expandase) 阻遏, 构

表 1 粗抽提物中头孢菌素合成酶比活性的比较

合成酶	活 性 范 围 ($\frac{\text{微克分子产物}}{\text{分钟} \cdot \text{毫克蛋白}}$)	
	顶头孢霉 C-10	棒状链霉菌 NRRL 3585
ACV 合成酶	$10^{-5} \sim 10^{-4}$	$10^{-5} \sim 10^{-4}$
环化酶	$10^{-3} \sim 10^{-2}$	$10^{-4} \sim 10^{-3}$
表异构酶	—	$10^{-4} \sim 10^{-3}$
扩环酶	$10^{-4} \sim 10^{-3}$	$10^{-4} \sim 10^{-3}$

成了对甲氧头孢菌素 (cephamycin) C 生物合成的负葡萄糖效应, 但 C-AMP 不能逆转葡萄糖效应。我们曾提出顶头孢霉和棒状链霉菌易于利用的碳源对 ACV 合成酶反应步骤起着负的效应^[9], 因为在顶头孢霉 CW-19 中扩环酶的阻遏和环化酶不受阻遏, 不能解释由过量葡萄糖引起的青霉素 N 积累的减少。虽然有报道指出, 对于棒状链霉菌 NRRL 3585, 只有扩环酶对碳源是敏感的, 但用麦芽糖作碳源补充, 甲氧头孢菌素 C 及其中间体和青霉素 N 的产量都降低了^[10,11]。由于没有一个可重复的非细胞体系的测定法, 我们就不能明确这些菌株的 ACV 合成酶自身是否受葡萄糖效应的调控, 和什么类型的调控 (阻遏、抑制或其他类型), 虽然有的研究者认为是阻遏^[5,6]。应该指出, 由于葡萄糖的存在, 降低 ACV 库或 [C^{14}] 缬氨酸渗入 ACV 并不一定意味着 ACV 合成酶的形成是受葡萄糖阻遏的。

最近, 我们研究了顶头孢霉 C-10 菌株的碳源调节^[12], 它是由顶头孢霉 CW-19 经一系列突变而获得的一株头孢菌素 C 高产菌株。C-10 菌株是由 Panlabs, Inc. 建立的, 保存在美国菌种

本文于 1989 年 10 月 25 日收到。

本文由魏中获同志译自该文英文稿。

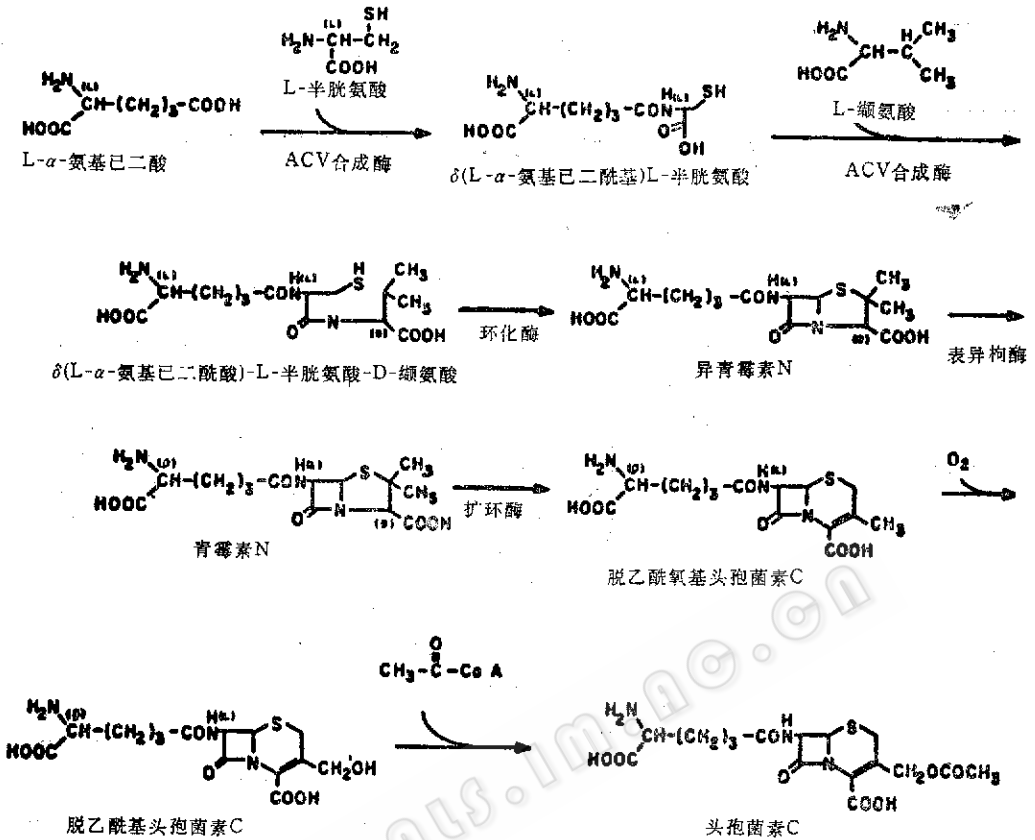


图 1 头孢菌素的生物合成途径

Fig.1 Biosynthetic pathway of cephalosporins

保藏委员会 (American Type Culture Collection) 命名和编号为产黄顶孢霉 (*Acremonium chrysogenum*) ATCC48272。采用限量的磷酸盐浓度以控制生长速率,我们在培养基中选用二种葡萄糖浓度 (2.7%和6.3%) 作为碳源结果发现,不象扩环酶那样受到强烈的阻遏,ACV 合成酶和环化酶的形成,即使用较高浓度的葡萄糖也一点不受阻遏;而青霉素N的积累与 β -内酰胺物质总量则一起减少。用2.7%和6.3%二种浓度的甘油作为碳源的试验获得相似的结果,即ACV合成酶的形成不受这易於利用碳源的阻遏,而该碳源却能减少抗生素的形成。用较早的菌种顶头孢霉CW-19我们也没有观察到葡萄糖对ACV合成酶的阻遏^[12]。胞外青霉素N积累由于葡萄糖而减少,因此设想葡萄糖及其代谢物可能对途径中某一早期步骤起抑制作用。我们还做了静止细胞试验,观察到在蛋白合成完全抑制情况下(用环己酰亚胺抑制),加入葡萄糖则减少青霉素N的

生成。这进一步增强我们猜测在碳源调节中,是否某一早期酶的作用受到抑制起了作用。许多较早的研究工作也支持这种观点^[13],就是能迅速利用碳源处于生长期收获的静止细胞最具生产活性。Cortes等^[7]也报道,存在过量的葡萄糖时,诺卡氏菌形成 β -内酰胺生物合成酶系,但并不产生甲氧头孢菌素C。需要回答的问题是受葡萄糖或其代谢物抑制的是哪一个早期酶。我们用非细胞粗抽出液进行ACV合成酶系的研究以及体外抑制结果(表2)指出,ACV合成酶作用受葡萄糖强烈的抑制,但是环化酶不受抑制。还发现葡萄糖的二个中间代谢物,葡萄糖-6-磷酸和甘油醛-3-磷酸,抑制ACV合成酶的活性(表2),其它具有抑制作用的碳源是麦芽糖、果糖、甘露糖、蔗糖,抑制作用较小的有半乳糖和乳糖。该效应的专一性、它的作用机制和重要性是目前正在研究的课题。如果ACV合成酶活性的“糖抑制作用”在体内是显著的;它可以解释

ACV 积累的负葡萄糖调节作用和碳源对β-内酰胺生成的调控作用。

棒状链霉菌NRRL3585是一株不能利用葡萄糖作为碳源,但受碳源调节的菌株^[14]麦芽

表 2 葡萄糖及其代谢产物对顶头孢霉的头孢菌素合成酶活性的抑制作用

化 合 物	浓度 (mmol/L)	ACV合成酶	环化酶 (%)	抑制作用 (%)
葡萄糖	5	71	—	—
	10	81	0	0
葡萄糖-6-磷酸	5	43	7	13
	10	80	—	—
甘油醛-3-磷酸	5	45	0	0
	10	67	—	—
3-磷酸甘油酸	5	0	11	38
	20	—	30	64

糖^[10]和甘油^[11]阻遏其生成扩环酶和甲氧头孢菌素C。虽然我们没有观察到甘油对ACV合成酶的明显的阻遏或抑制,却发现甘油的一个代谢物,甘油醛-3-磷酸对ACV合成酶活性有相当可观的抑制,即5mmol/L抑制活性80%(结果待发表)。

因此,对于顶头孢霉和棒状链霉菌,ACV合成酶的形成不受易於利用的碳源的阻遏,抑制效应可能是由于碳源的调节作用。

(二) 氮源调节

真菌和放线菌的β-内酰胺抗生素生物合成受氮源的调节^[15,16]。易于同化的氮源如铵离子产生负效应的机制之一是对途径中β-内酰胺合成酶的阻遏(可能也有抑制)。对于顶头孢霉CW-19,我们发现铵离子阻遏扩环酶,但对环化酶的形成仅稍有作用;而高浓度的铵离子阻止产生青霉素N。该氮源的耗尽不仅导致头孢菌素C的增加,青霉素N也有较少量的增加,指明途径中某一早期酶成为又一种负调控。Brana等^[18]比较棒状链霉菌NRRL3585三种酶,发现环化酶对铵阻遏最敏感,扩环酶中度敏感,表异构酶(epimerase)则不受明显的作用;这些合成酶都不受NH₄⁺的抑制。由于环化酶在合成途径中不是第一个酶,Brana等^[18]对ACV三肽合成的调控机制提出了假设。实际上,Castro等^[19]虽然不能直接试验铵离子对ACV合成酶的作用,他们观察到诺卡氏菌生长在高浓度的铵离子中,ACV在菌体内的积累减少。环化酶、表异构酶和扩环酶受NH₄⁺阻遏,但是不受抑制。

我们用顶头孢霉C-10和棒状链霉菌NRRL

3585二菌株研究铵离子对ACV合成酶形成和作用的直接影响。对于真菌菌株C-10^[20],1.2%硫酸铵阻遏ACV合成酶和扩环酶的活力均约为50%(与天冬酰胺作为氮源比较),而对环化酶形成的影响不明显。当硫酸铵浓度增加到3.5%,前二个酶进一步受阻遏。正如所预期的,当使用较高浓度的铵离子时,β-内酰胺抗生素的总量和青霉素N的产生都会减少。铵离子对ACV合成酶活性的体外抑制作用相当弱,抑制50%活性需要1.7%(NH₄)₂SO₄(250mmol/LNH₄⁺)。对于放线菌株NRRL3585^[21]铵离子调节甲氧头孢菌素具有不同于顶头孢霉和诺卡氏菌观察到的模式(表3)。在此,正如我们以前假设的^[18],ACV合成酶受到铵离子的阻遏。在四个试验的酶中,ACV合成酶是最受阻遏的酶(培养基中加120mmol/LNH₄⁺,酶活减少75%),其次是环化酶(减少70%)和扩环酶(减少50%);表异构酶仅稍受影响。再次观察到ACV合成酶受NH₄⁺弱抑制(80mmol/L的NH₄⁺只抑制20%酶活)。因此,对于棒状链霉菌生物合成头孢菌素中,ACV合成酶、环化酶和扩环酶是受铵离子负作用的主要因子。由于在真菌和放线菌二种菌株中观察到ACV合成酶生物合成受铵离子阻遏,Castro等^[19]发现用诺卡氏菌补充铵离子的培养中,ACV库显著缩小,可能也是出于同样的作用机制。因为在培养基中添加或不添加铵离子,难以测定胞内库中作为前体的氨基酸(半胱氨酸、缬氨酸和α-氨基己二酸),故不清楚过量的铵离子对三肽形成所需的氨基酸影响到何种程度^[19]。

(三) 磷源调节

已有报道指出,棒状链霉菌^[22-24]、真菌^[25]产生 β -内酰胺抗生素受到磷酸盐的调控。用顶头孢霉W53253, Kuenzi^[26]推测过量的磷酸盐促使加快葡萄糖消耗的速率而起间接的负作用,因而加强了碳源的阻遏作用。但是Martin等^[25]用顶头孢霉CW-19的静止细胞当不存在葡萄糖时,磷酸盐也干扰头孢菌素C和青霉素N的产生,因而提出磷酸盐本身降低了头孢菌素生物合成途径的总流量。我们最近用顶头孢霉C-10研究磷酸盐对 β -内酰胺抗生素的作用^[27]。25mmol/L和215mmol/L磷酸盐都不增加葡萄糖消耗的速率,但是强烈抑制 β -内酰胺抗生素的产生;测定所有三个合成酶,即ACV合成酶、环化酶和扩环酶,在高浓度磷酸盐时,它们的形成都受到阻遏。这些酶的活性在体外也受磷酸盐的抑制,当50mmol/L磷酸盐时,扩环酶活力抑制60%,ACV合成酶是50%,环化酶是45%。扩环酶在三个酶中也是最受阻遏的。扩环酶对阻遏和抑制的高度敏感性可以解释,为什么当用顶头孢霉CW-19静止细胞实验时,增加磷酸盐浓度使生物合成青霉素N减少比合成头孢菌素C减少要小得多的结果^[25]。

我们较早的报道^[28]棒状链霉菌NRRL3585的扩环酶受磷酸盐的阻遏,扩环酶和环化酶也受磷酸盐的抑制。表异构酶既不受阻遏,也不受抑制。Lebrihi等^[24],进一步证实了磷酸盐对扩环酶的阻遏作用。然而,没有有关磷酸盐对放线菌ACV合成酶的调节作用的报道。我们最近发现^[29](表4)与20mmol/L磷酸盐(是我们的合成培养基中的常规浓度)比较,60mmol/L磷酸盐显著减少头孢菌素的产生和阻遏所有四个研究的合成酶(ACV合成酶、环化酶、表异构酶和扩

环酶),ACV合成酶是主要阻遏目标,扩环酶其次。如此多的合成酶受阻遏,其情况相似于顶头孢霉C-10(见前面)。与Lubbe等^[23]报道的20mmol/L磷酸盐抑制几乎100%的扩环酶和50%环化酶相比较,80mmol/L磷酸盐仅抑制30%ACV合成酶活性^[29],显然磷酸盐的抑制作用是相当小的。

总之,磷酸盐阻遏ACV合成酶的生物合成造成磷酸盐对 β -内酰胺生物合成的负调节作用。ACV合成酶活性的抑制作用可能是另一个因子,但是磷酸盐的胞内浓度尚未测定。

(四) 甲硫氨酸调节

甲硫氨酸显著促进顶头孢霉形成头孢菌素和青霉素N。虽然该氨基酸把硫原子提供给抗生素^[30,31],促进作用不是由于作为前体的作用,而是起着调节作用,因为正亮氨酸一个不含硫的甲硫氨酸类似物,也具有促进作用^[32],促进作用可能包含两方面,即甲硫氨酸和正亮氨酸对菌丝形态的作用^[33]以及对形成头孢菌素生物合成途径中某些酶的作用^[20]。在顶头孢霉中,甲硫氨酸是 β -内酰胺合成酶的诱导物,而且ACV合成酶是甲硫氨酸作用的主要位点。用顶头孢霉突变菌株N-2,在ACV阶段受阻^[34,35],5g/L DL-甲硫氨酸增加ACV产量(胞内加胞外)4倍^[20]。用高产菌顶头孢霉C-10,添加甲硫氨酸诱导ACV合成酶的形成,随之增加 β -内酰胺产生的速率。用该菌株,甲硫氨酸对环化酶和扩环酶的作用相当小,这与较早的菌株CW-19却相反,后一菌株随着ACV和ACV合成酶的形成^[36,29],环化酶和扩环酶的生物合成受甲硫氨酸的诱导。甲硫氨酸既不活化也不抑制ACV合成酶的活性^[1]。

表 3 铵离子对棒状链霉菌的头孢菌素合成和合成酶的形成作用

氮 源	最大生长	最大头孢菌素量	最大ACV 合成酶量	最大环 化酶量	最大表异 构酶量	最大扩环 酶量
	(毫克干菌重/ml)	($\mu\text{g}/\text{mg}$)				
15mmol/L L-天冬酰胺	5.16	82.0	0.148	2.12	2.17	1.40
15mmol/L L-天冬酰胺 + 120mmol/L NH ₄ Cl	4.81	16.5	0.037	0.61	1.84	0.67

所列数据为120h发酵周期中取样6次测定中的最大值

表 4 磷酸盐对棒状链霉素的头孢菌素生物合成和合成酶的形成的作用

培养基中磷酸盐的浓度 (mmol/L)	最大生长 (毫克干菌重/ml)	最大头孢菌素量 ($\mu\text{g/ml}$)	最大ACV合成酶量	最大环化酶 (毫单位/毫克蛋白)	最大表异构酶量	最大扩环酶量
20	5.77	88.8	0.113	1.70	1.71	2.04
60	5.77	33.4	0.055	1.22	1.56	1.24

所列数据为108h发酵周期中取样7次测定中的最大值

参 考 文 献

- [1] Banko, G. et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 109:2858—2860, 1987.
- [2] Jensen, S. E. et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 49:213—218, 1988.
- [3] Demain, A. L. et al., *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 29:163—185, 1979.
- [4] Martin, J. F. et al., *Antibiotics Containing the β -Lactam Structure*, part 1. Springer-Verlag, Heidelberg, pp.229—254, 1983.
- [5] Lopez-Nieto, M. J. et al., *Abstr. 4th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganism*, Kyoto, 1982.
- [6] Revilla, G. et al., *J. Bacteriol.*, 168:947—952, 1986.
- [7] Cortes, J. et al., *Proc. 3rd Eur. Congr. Biotechnol.*, Vol, 1, I—21—I—27, 1984.
- [8] Cortes J. et al., *J. Gen. Microbiol.*, 132:1805—1814, 1986.
- [9] Heim, J. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19:232—236, 1984.
- [10] Rollins, M. J. et al., *Biotechnol. Lett.*, 10:295—300, 1988.
- [11] Lebrini, A. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28:44—51, 1988.
- [12] Zhang, J. Y. et al., *Curr. Microbiol.*, In press, 1989.
- [13] Demain, A. L. et al., *J. Ferm. Technol.*, 36:323—328, 1976.
- [14] Brana, A. F. et al., *Biotechnol. Lett.*, 5:791—794, 1983.
- [15] Aharonowitz, Y. and Demain, A. L., *Can. J. Microbiol.*, 25:61—67, 1979.
- [16] Aharonowitz, Y., *Annu. Rev. Microbiol.*, 34:209—233, 1980.
- [17] Shen, Y.-Q. et al., *J. Antibiotics*, 37:503—511, 1984.
- [18] Beana, A. F. et al., *Can. J. Microbiol.*, 31:736—743, 1985.
- [19] Castro, J.M. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22:32—40, 1985.
- [20] Zhang, J.-Y. et al., *J. Ind. Microbiol.*, 2:251—255, 1987.
- [21] Zhang, J.-Y. et al., Submitted, 1989.
- [22] Aharonowitz, Y. et al., *Arch. Microbiol.*, 115:169—173, 1977.
- [23] Lubbe, C. et al., *Arch. Microbiol.*, 140:317—320, 1985.
- [24] Lebrini, A. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26:130—135, 1987.
- [25] Marsin, J. F. et al., *Trends in Antibiotic Research*, Japan Antibiotics Research Association, pp.228—268, 1982.
- [26] Kuenzi, M. T., *Arch. Microbiol.*, 128:78—83, 1980.
- [27] Zhang, J.-Y. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29:242—247, 1988.
- [28] Lubbe, C. et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 25:75—79, 1984.
- [29] Zhang, J.-Y., Submitted, 1989.
- [30] Caltrider, P. G. and Niss, R. F., *Appl. Microbiol.*, 14:746—753, 1966.
- [31] Nuesch, J. et al., *Genetics of Industrial Microorganism: Actinomycetes and Fungi*. American Elsevier, New York, pp. 309—334, 1973.
- [32] Demain, A. L. et al., *J. Bacteriol.*, 85:339—344, 1963.
- [33] Drew, S. W. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 31:143—145, 1976.
- [34] Shirafuji, H. et al., *Agric. Biol. Chem.*, 43:155—160, 1979.
- [35] Ramos, F. R. et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 35:123—127, 1986.
- [36] Alonso, M. J. and Luengo, J. M., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31:357—359, 1987.