

# 抗生素 AGPM 生物合成途径的初步研究\*

陈贵斌 牛晋阳 张建勇 元英进\*\* 胡宗定

(天津大学化工学院 天津 300072)

**摘要:**采用前体添加实验法、静息细胞培养法以及酶抑制剂法对藤黄灰链霉菌中抗生素 AGPM 生物合成途径进行了初步探讨。研究表明能转化成聚酮合成所需活性前体的氨基酸如异亮氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、谷氨酸等以及短链脂肪酸乙酸、丙酸、丁酸盐对抗生素 AGPM 合成均有明显促进作用;另外,在培养基中添加脂肪酸和聚酮生物合成途径的专一性抑制剂浅蓝菌素(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )或脂肪酸合成抑制剂碘乙酰胺(0.5 $\text{mmol}/\text{L}$ )时,菌体生长不受影响,而抗生素 AGPM 合成受到强烈抑制,分别为对照的 35.3% 和 26.2%;当碘乙酰胺的浓度为 1  $\text{mmol}/\text{L}$  时,抗生素 AGPM 合成几乎完全受到抑制。由此初步推断抗生素 AGPM 是由聚酮途径合成。

**关键词:**抗生素 AGPM,生物合成途径,聚酮途径,藤黄灰链霉菌

中图分类号:Q933 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2003)05-0032-06

## STUDY ON BIOSYNTHESIS PATHWAYS OF ANTIBIOTIC AGPM

CHEN Gui-Bin NIU Jin-Yang ZHANG Jian-Yong YUAN Yin-Jin HU Zong-Ding

(*Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072*)

**Abstract:** A new antitumor antibiotic AGPM biosynthesis pathways was studied with feeding experiment, resting cell system and enzyme inhibitor experiments. The results showed that addition of the amino acids and branched fatty acids such as Ile, Val, Met, Glu and acetate, propionate and butyrate, which could be transformed to active precursors of polyketide, could effectively improve the production of antibiotic AGPM. Cerulenin (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and iodoacetamide

\* 国家高技术研究发展计划项目 (“863”项目) (No. 2001AA214081)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2001AA214081)

\* 联系人 Tel: 022-27403888, E-mail: yjyuan@public.tpt.tj.cn

收稿日期: 2002-11-06, 修回日期: 2003-01-20

(0.5mmol/L)-specific inhibitors of polyketide synthase and fatty acids synthase could decrease antibiotic production to 35.3% and 26.2% that of control respectively, without affecting cell growth. When idioacetamide concentration increased to 1.0mmol/L, antibiotic AGPM production would be fully inhibited. All these results testified antibiotic AGPM was biosynthesized by polyketide pathway.

**Key words:** Biosynthesis Pathway, Antibiotic AGPM, Polyketide, *Streptomyces Luteogriseus*

长期以来,改造抗生素生物合成途径使抗生素高产或得到效价更高的新抗生素一直是人们所追求的目标。但由于缺乏抗生素生物合成以及其调控机制的知识,抗生素菌种的改良只能借助于传统诱变和筛选方法。自从20世纪80年代,随着链霉菌、曲霉、青霉等抗生素产生菌DNA重组技术发展,利用基因工程技术对抗生素生物合成途径进行改造成为可能<sup>[1]</sup>。这就要求人们对各种抗生素生物合成过程中限速步骤、关键酶、以及它们与基因的对应关系有详细深入的了解,才能用基因操作方法进行生物合成的控制。另外,随着抗生素的大量使用,人们也面临病原菌抗药性这一重大问题。解决这些问题方法之一就是根据人们对抗生素生物合成机理的认识,利用基因工程技术得到杂合抗生素<sup>[2,3]</sup>或利用生物转化和有机化学合成方法改造已有抗生素以达到新的治疗效果。因此,抗生素,尤其新型抗生素(先导化合物)的生物合成途径研究对进一步提高抗生产率和新药开发具有重大意义。

抗生素APGM是由新发现的藤黄灰链霉菌(*S. Luteogriseus*)产生的一种新型抗生素,体外实验研究结果表明其对非小细胞肺癌、白血病抑制作用比紫杉醇、多烯紫杉醇效果高10~100倍,另外其结构类似物对小麦赤霉病、黄瓜炭疽等17种由真菌引起的植物病害有很好的防治作用,具有良好的应用开发前景和研究价值<sup>[4]</sup>。抗生素AGPM的结构<sup>[5]</sup>与大环内酯类抗生素有相似之处,但由于含有许多杂环,因而其生物合成途径可能更加复杂。本文拟通过各种氨基酸和短链脂肪酸对抗生素AGPM的刺激试验、静息细胞培养试验和添加酶抑制剂等方法,初步推断其生物合成途径和选择合适同位素标记前体,为下一步用同位素示踪法和诱变筛选阻断突变株研究其在藤黄灰链霉菌中的生物合成途径与代谢调控机制奠定良好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

藤黄灰链霉菌(*Streptomyces luteogriseus*)为本实验室从土壤中分离保藏。

### 1.2 培养基

用于培养藤黄灰链霉菌的固体斜面培养基、液体种子培养基和发酵培养基均按文献[4]配制。而静息培养则采用文献[6]略加改变的培养液:葡萄糖5g,天冬氨酸1.6g, Mg-SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g, NaCl 1g; 0.1mol 吗啉基丙磺酸,加蒸馏水定容至1L, pH 6.5,其它组分同文献[6]。

### 1.3 培养方法

斜面种子培养和液体种子培养参见文献[4]。在氨基酸和短链脂肪酸刺激试验中以10%(V/V)的接种量将液体种子接入装有50mL发酵培养基的250mL摇瓶中培养4d;静止细胞实验则在培养2d后离心收集菌体(5,000r/min, 10min),再用无菌水洗涤3次后悬浮在培养液中(浓度为10g湿菌体/L培养液),然后加入各种氨基酸或短链脂肪酸盐培养

2d。添加酶抑制剂的试验则在装有 15mL 发酵培养基的 100mL 摇瓶中进行,从 0h 起每天添加终浓度为  $25\mu\text{g/mL}$  的聚酮合成酶(PKS)抑制剂浅蓝菌素(cerulenin)或者脂肪酸合成抑制剂碘乙酰胺,连续培养 5d。

#### 1.4 抗生素 AGPM 测定方法

HPLC 法测定。取 10mL 发酵液,加入 20mL 二氯甲烷萃取两次,萃取液蒸发至干,然后加入 1mL 甲醇,再用  $0.22\mu\text{m}$  滤膜过滤后上样分析。色谱柱采用 Waters™ Nova-Pak® C18 柱,流动相为甲醇和乙酸铵溶液( $0.01\text{mol/L}$ ,  $\text{pH} = 8.20$ ),采取梯度洗脱方法,甲醇浓度在 60min 内从 30% 升至 50%,检测波长为 330nm。含量根据色谱峰面积与标准品的峰面积对比计算。

#### 1.5 生物量测定方法

用干重法测定。将发酵液过滤,用蒸馏水洗涤菌体 3 次后  $102^\circ\text{C}$  干燥至恒重后称重。

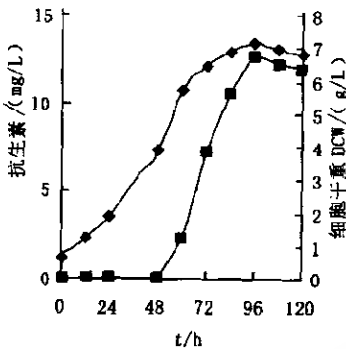


图1 藤黄灰链霉菌生长曲线

■ C, ◆ DCW

## 2 结果与讨论

### 2.1 前体添加时间的确定

次级代谢的一个特征是次级代谢产物通常是在菌体的分化期合成,在分化期添加外源前体物质才能说明其是否起到前体的促进作用。因此首先必须通过实验绘制抗生素产生菌生长曲线和产物生成曲线,确定前体添加的合适时间。实验结果如图 1 所示。从图 1 可以看出,在 48h 左右,细胞生长进入指数生长后期,抗生素 AGPM 开始产生,此时开始补加适当浓度前体将有利于抗生素合成。因此选择培养 48h 后添加氨基酸和短链脂肪酸来考察其对抗生素影响,并采取少量多次流加方式(每天加 1 次)以消除可能带来反馈抑制。

### 2.2 各种氨基酸对抗生素 AGPM 的刺激试验

氨基酸作为抗生素生物合成的前体广泛存在,如异亮氨酸、缬氨酸、蛋氨酸等的分解代谢物可以直接作为多种抗生素碳骨架的组成部分。本文研究了 20 种不同氨基酸对抗生素 AGPM 产率的影响,由于篇幅关系,只将具有明显促进作用的各种氨基酸实验结果列于表 1。从表 1 可以看出,添加异亮氨酸比菌体产率较大,甘氨酸稍小,但比对照均有

表 1 各种氨基酸和氨基酸前体对抗生素 AGPM 产率的影响

添加氨基酸	最终浓度 (mmol/L)	菌体量 (g/L)	抗生素 AGPM 产率	
			发酵液中效价 (mg/L)	产率 (mg/g 于菌体)
对照	0	7.20	14.89	2.07
甘氨酸	1	7.12	14.09	1.98
	2	7.06	15.06	2.13
	3	6.76	15.47	2.29
	4	6.72	19.24	2.86
	5	6.98	20.15	2.89
谷氨酸	1	6.64	23.28	3.51
	2	6.88	24.71	3.59
	3	7.30	23.98	3.29
	4	7.54	7.506	0.995

续表 1

	5	7.64	7.072	0.926
异亮氨酸	1	6.08	19.07	3.14
	2	6.18	20.06	3.25
	3	6.06	18.35	3.03
	4	5.96	20.66	3.47
	5	6.22	20.66	3.32
缬氨酸	1	6.12	23.98	3.92
	2	6.23	23.28	3.74
	3	6.18	23.28	3.77
	4	6.38	14.89	2.33
	5	6.72	8.208	1.22
精氨酸	1	7.23	23.28	3.22
	2	7.32	20.06	2.74
	3	7.24	18.34	2.53
	4	7.38	15.34	2.08
	5	7.56	13.62	1.80
蛋氨酸	1	6.22	24.71	3.97
	2	6.02	19.00	3.16
	3	5.72	13.62	2.38
	4	6.04	11.16	1.85
	5	5.52	9.526	1.73

明显提高。谷氨酸、缬氨酸、精氨酸和蛋氨酸在低浓度时有明显的促进作用,随着浓度增加具有抑制作用。除了流加精氨酸和谷氨酸细胞干重略有增加外,添加其它各种氨基酸对细胞生长无明显的变化。这说明抗生素的产率增加并非是由于生物量增加引起的,而是由于添加氨基酸后使前体的代谢库增加,进而刺激抗生素合成所引起的。另外,从具有明显刺激作用的氨基酸种类来看,类似于对聚酮合成有刺激作用的氨基酸<sup>[7]</sup>。

### 2.3 添加短链脂肪酸对抗生素 AGPM 产率的影响

由于乙酸、丙酸以及其它短链脂肪酸可以经过胞内的磷酸激酶催化形成多聚酮的活性分子如乙酰 CoA、丙酰 CoA、丙二酰 CoA 和甲基丙二酰 CoA,因而添加这些短链脂肪酸有可能促进由聚酮(polyketide)途径合成的抗生素生物合成。为此考察以下几种短链脂肪酸盐对抗生素 AGPM 的影响,结果见表 2。

表 2 添加各种短链脂肪酸对抗生素 AGPM 的产率影响

短链 脂肪酸	加入最终浓度 (mmol/L)	菌体量 (g/L)	抗生素 AGPM 产率	
			发酵液中效价 (mg/L)	比菌体得率 (mg/g 干菌体)
对照	0	6.85	13.62	1.99
乙酸	1	7.02	16.78	2.39
	2	7.26	11.06	1.52
	4	6.22	7.072	1.14
	1	6.74	16.28	2.42
丙酸	2	6.32	21.28	3.37
	4	6.34	19.47	3.07
	1	6.18	17.28	2.80
丁酸	2	6.68	11.39	1.71
	4	6.24	9.526	1.53
	1	6.02	10.11	1.68
异丁酸	2	5.91	7.072	1.20
	4	5.82	3.898	0.670

由表2可以看出,在培养基中添加丙酸和较低浓度乙酸、丁酸盐可使抗生素 AGPM 的产量以及得率有明显增加;而添加异丁酸抗生素产率反而降低。由此表明乙酸、丙酸以及丁酸可以作为抗生素 AGPM 的前体。

### 2.4 静息细胞培养体系中各种氨基酸和短链脂肪酸对抗生素 AGPM 的影响

为了消除培养基成分和菌体量对抗生素 AGPM 产率的影响,进一步验证以上结果,我们采用静息细胞培养体系,选择有较明显促进作用浓度(1mmol/L 和 2mmol/L)进行实验,结果如图2及图3所示。

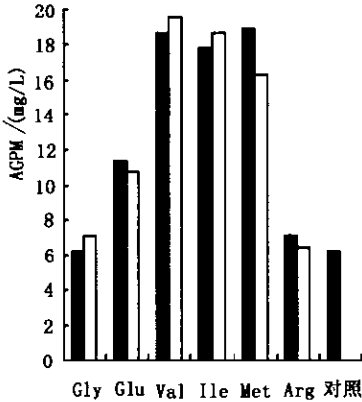


图2 静息细胞培养过程中氨基酸对产素的影响  
■ 1mmol/L, □ 2mmol/L

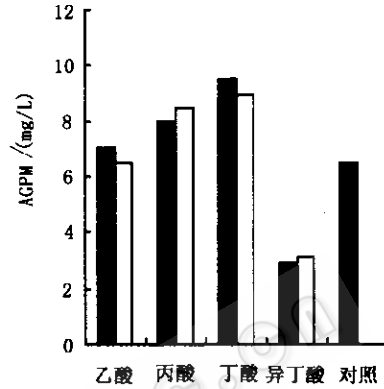


图3 静息细胞培养过程中短链脂肪酸对产素的影响  
■ 1mmol/L, □ 2mmol/L

由图2可以看出添加缬氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、谷氨酸发酵液中抗生素效价明显增加。另外,从图3可以看出添加丙酸和丁酸对抗生素效价亦有较高刺激作用。由于聚酮途径合成的抗生素的生物中间体一般由乙酰 CoA、丙酰 CoA、丙二酰 CoA 和甲基丙二酰 CoA 缩合形成。这些前体不仅可以通过短链脂肪酸激酶合成,还能由缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸和甲硫氨酸脱氨作用和琥珀酰 CoA 变位作用形成,因而在培养基中添加这些氨基酸或短链脂肪酸能使抗生素产率有所提高。以上实验结果进一步证明抗生素 AGPM 很可能是通过聚酮途径合成的。

### 2.5 添加酶抑制剂对抗生素 AGPM 生物合成的影响

为了进一步确证抗生素 AGPM 是由聚酮途径合成,考察聚酮合成途径和脂肪酸合成专一性抑制剂浅蓝菌素以及脂肪酸合成抑制剂碘代乙酰胺对抗生素 AGPM 生物合成影响,结果如图4所示。

从图4可以看出,当加入最终浓度为 25μg/mL 浅蓝菌素和 0.5mmol/L 碘乙酰胺时,菌体生物量与对照相差无几;而培养 5d 后发酵液中抗生素的效价分别为对照的 35.27% 和 26.2%,说明加入 25μg/mL 浅蓝菌素和 0.5mmol/L 碘乙酰胺抑制抗生素 AGPM 合成。当碘乙酰胺的浓度增加到 1mmol/L 时,抗生素的合成受到完全的抑制。由于聚酮合成和脂肪酸合成具有相似机理,而且聚酮合成酶(PKS)与脂肪酸合成酶(FAS)有相似结构和功能<sup>[8,9]</sup>,浅蓝菌素抑制机理主要是与这两种酶上的酰基转运蛋白(ACP)结合而起到抑制作用,碘乙酰胺的作用是使 ACP 上转运酰基的磷酸泛酰巯基乙胺烷基化而失去转运功能<sup>[10]</sup>。我们认为浅蓝菌素和碘乙酰胺对抗生素 AGPM 生物合成抑制作用是由于藤黄灰

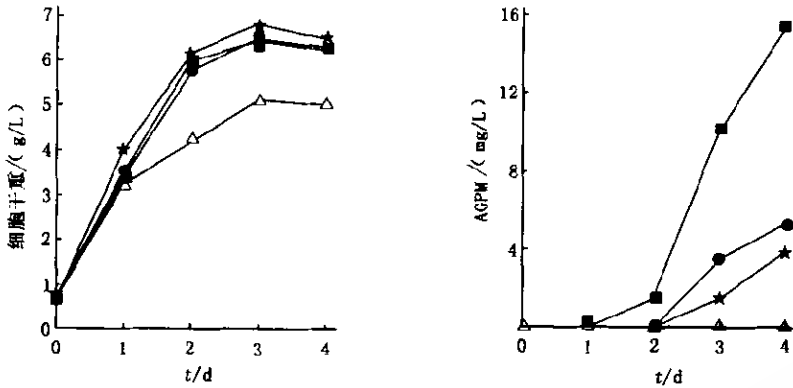


图4 添加抑制剂对菌体生物量和抗生素AGPM合成的影响

■—对照, ●—25µg/mL 浅蓝菌素, ★—0.5mmol/L 碘代乙酰胺, △—1mmol/L 碘代乙酰胺

链霉菌中抗生素AGPM也是通过聚酮途径合成,因而这两种抑制剂通过上述机制而发挥抑制作用。

### 3 结论与展望

前体添加实验和静息细胞培养实验表明缬氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、谷氨酸等氨基酸及乙酸、丙酸、丁酸等一些聚酮合成的前体可以作为抗生素生物合成的前体,渗入抗生素AGPM碳骨架中,从而使抗生素发酵单位提高,因此这些物质在研究抗生素AGPM分子中碳骨架来源以及其生物合成机理中可以作为同位素标记的前体。另外,这些实验以及聚酮合成的专一性抑制剂实验证明抗生素AGPM由聚酮途径合成。但是抗生素AGPM如何通过聚酮途径合成的,就需通过同位素标记实验,阻断突变株生化互补实验以及合成途径中关键酶、与之相关基因结构和功能分析才能逐步完善,我们将在以后陆续地报道。

### 参考文献

- [1] Malpartida F, Hopwood D A. *Nature*, 1984, **309**: 462 ~ 64.
- [2] Hopwood D A, Malpartida F, Kiser H M, *et al.* *Nature*, 1985, **314**: 642.
- [3] Hopwood D A. *Chem Rev*, 1997, **97**(7): 2465.
- [4] 石炳兴,赵红,刘喜朋,等. *过程工程学报*, 2001, **4**: 442 ~ 444.
- [5] 元美洗,石炳兴,胡宗定,等. *中国专利*, 2001, 01141443. X.
- [6] Bornmann C, Kalmanchelyi A. *J Antibiotics*, 1999, **52**(2): 102 ~ 108.
- [7] Pfeifer B A, Khosla C. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001, **65**: 106 ~ 108.
- [8] Hopwood D A, Sherman D H. *Annu Rev Genet*, 1990, **24**: 37 ~ 66.
- [9] Katz L, Donadio S. *Annu Rev Microbiol*, 1993, **47**: 875 ~ 912.
- [10] Salih J, Wakil. *Biochemistry*, 1989, **28**(11): 4523 ~ 4530.