

细菌代谢二氯甲烷的酶学和遗传学

蔡宝立

(南开大学分子生物学研究所, 天津 300071)

在工业生产和实验室中, 二氯甲烷(CH_2Cl_2) 被广泛地用作溶剂、提取剂和清除剂, 是一种主要的环境污染物。它在水中的最大溶解浓度约为 150 mmol/L ^[1]。哺乳动物与高浓度的或长期与低浓度的二氯甲烷接触, 容易引起癌症, 或者立即死亡^[2]。肝脏的细胞色素 P-

450 单氧酶能使二氯甲烷羟化, 引起中毒(图1)。二氯甲烷经羟化反应和消去反应产生甲酰氯, 甲酰氯经过借消去反应产生一氧化碳,

1993-11-05 收稿

一氧化碳与血红蛋白中的氧结合形成碳氧血红蛋白，从而引起窒息。空气中的二氯甲烷浓度达到400ppm时，生活在其中的动物则会因窒息而死亡。细胞内的甲酰氯能与亲核物质DNA发生反应，使DNA不能被修复，从而导致癌症发生。

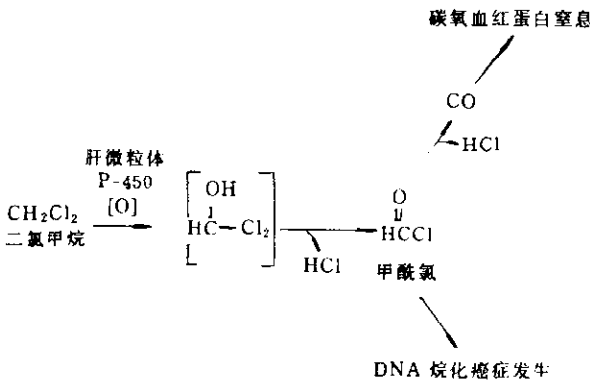


图1 哺乳动物肝脏中的二氯甲烷代谢

另一个引起人们关注的问题是二氯甲烷在环境中非常稳定，在中性pH的25℃水中，它的水解半衰期是704年^[3]。由于二氯甲烷具有毒性和持久性，所以被美国环保局(EPA)列入重点污染物名单中^[4]。

1 细菌代谢二氯甲烷的类型

1980年 Rittmann 等^[5]首次从工业废水中分离出以二氯甲烷为唯一碳源和能源的细菌。到目前为止，已有10多种代谢二氯甲烷的微生物被分离出来。微生物代谢二氯甲烷的类型有下面三种：1. 好氧嗜甲基细菌产生的二氯甲烷脱卤素酶，在有谷胱甘肽(GSH)存在的条件下，催化二氯甲烷脱卤素反应，产生甲醛，甲醛进一步氧化产生能量，或者通过异化作用进行生物合成(图2A)^[6,7]。2. 好氧嗜甲烷细菌产生的甲烷单氧酶使二氯甲烷氧化成甲酰氯，同时脱掉一个氯原子，然后水解脱氯，产生甲醛(图2B)^[8]，其代谢途径与哺乳动物细胞色素P-450单氧酶催化的二氯甲烷氧化反应类似(图1)。3. 某些厌氧细菌也能代谢二氯甲烷，终

产物是二氧化碳(图2C)，但脱卤素机制尚不清楚^[9,10]。本文介绍正被广泛研究的第一种类型。

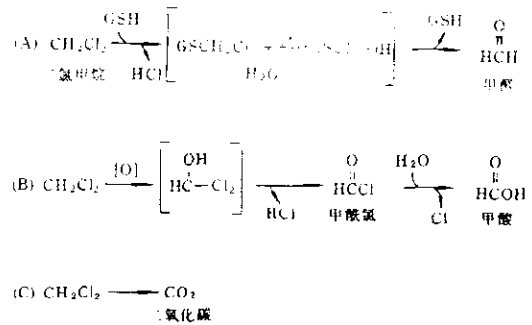


图2 细菌的二氯甲烷代谢

- (A) 好氧嗜甲基细菌二氯甲烷脱卤素酶催化的反应
- (B) 好氧嗜甲烷细菌甲烷单氧酶催化的反应
- (C) 厌氧菌的二氯甲烷代谢

2 二氯甲烷脱卤素酶

产生二氯甲烷脱卤素酶的细菌都是嗜甲基细菌。这类菌株的大多数是由瑞士的 Leisinger 实验室分离的^[7,11]。纯化的二氯甲烷脱卤素酶可以把二氯甲烷、二溴甲烷、二碘甲烷、氯溴甲烷和氯碘甲烷等含2个卤原子的甲烷衍生物转化成甲醛，但不能转化CH₃Cl和CHCl₃以及氯代乙烷、氯代丙烷和氯代烯烃等^[4,6,12]。酶催化的脱卤素反应依赖于GSH。Leisinger 和他的合作者根据大鼠肝脏的蛋白提取物催化依赖于GSH的二氯甲烷水解反应^[13]，提出了二氯甲烷脱卤素酶的催化机制，即在酶的催化下，GSH与二氯甲烷形成S-氯甲基谷胱甘肽复合物，复合物经过非酶水解反应产生S-羟甲基谷胱甘肽，然后自动裂解成甲醛和还原型GSH。GSH在反应中行使起始亲核剂的功能，是酶催化反应不可缺少的媒介物(图2A)^[6]。

根据酶的N-末端氨基酸顺序、酶联免疫反应(ELISA)和酶反应一级速度常数kcat的不同，可以把二氯甲烷脱卤素酶分成A组和B组两大类^[4,7]。A组酶包括DM1、DM2和DM4脱卤素酶等，它们的kcat值较低(33/min)。B组

酶 kcat 值是 A 组酶的 6 倍 (197/min)，目前只鉴定出 DM11 脱卤素酶属于这一组。这两组酶的同异见表 1。A 组酶具有相同的性质，表 1 中以 DM4 脱卤素酶为代表。

因为 GSH 的半胱氨酸残基含有一个硫氢基 (HS⁻)，所以对细菌的二氯甲烷脱卤素酶以及大鼠肝脏的谷胱甘肽 S-转移酶催化二氯甲烷脱卤素反应的速度和二硫化物阴离子 (HS⁻) 硫解二卤甲烷和其它二卤甲烷的化学反应速度进行比较，可以进一步了解酶的反应机制。与羟离子 (HO⁻) 相比，二硫化物阴离子是一种更强的亲核剂，但它与二氯甲烷的非催化反应的反应速度是很低的，其二级反应速度常数只有 $6.02 \times 10^{-6} \text{S}^{-1}\text{M}^{-1}$ (表 2)。可以利用二级反应速度常数 (kcat/K_m) 对酶催化反应的速度进行比较。Wackett 和 Blocki^[4] 最近分离到大鼠肝脏谷胱甘肽 S-转移酶的同工酶，并利用 Ahmed

的数据^[13]，计算出大鼠肝脏的谷胱甘肽 S-转移酶的 kcat/K_m 的平均值是 $3.4 \text{S}^{-1}\text{M}^{-1}$ 。从表 2 可见，这个数值大约是非催化反应的二级反应速度常数的 10⁵ 倍。来自细菌的 B 组脱卤素酶 DM11 的 kcat/K_m 值是非催化反应的 10 倍，A 组的 DM4 脱卤素酶是非催化反应的 10⁹ 倍。

表 1 A 和 B 组二氯甲烷脱卤素酶的性质比较

		A 组酶(DM4)	B 组酶(DM11)
类 似 性	底物	CH ₂ X ₂	CH ₂ X ₂
	GSH	需要	需要
	分子量	35000	34000
区 别	DM4 基因探针	杂交	杂交
	N-末端氨基酸顺序	ser-pro-asn-pro	thr-lys-leu-arg
	DM4 抗体 ELISA 测定	>10 ⁵	4.5 × 10 ²
	kcat (min ⁻¹)	33	197

表中数据来自文献[7,11,12,14]

表 2 二硫化物阴离子、大鼠肝脏谷胱甘肽 S-转移酶和细菌 DM11 菌株二氯甲烷脱卤素酶与二卤甲烷反应的动力学参数^[4]

底物	二硫化物阴离子 (HS ⁻)		谷胱甘肽转移酶		二氯甲烷脱卤素酶		
	kobs (S ⁻¹ M ⁻¹)	相对 k 值	kcat/K _m (S ⁻¹ M ⁻¹)	相对 k 值	kcat/K _m (S ⁻¹ M ⁻¹)	相对 k 值	k _{cat} /k _{HS⁻}
CH ₂ Cl ₂	6.02×10^{-6}	1.0	3.4	1.0	6.1×10^4	1.0	1.0×10^{10}
CH ₂ Br ₂	1.74×10^{-4}	28.9	18.6	5.5	2.7×10^5	4.4	1.6×10^9
CH ₂ Br Cl	2.42×10^{-4}	40.2	19.3	5.7	3.5×10^5	5.7	1.4×10^9

注: kobs 为二级速率常数

为了进一步了解细菌脱卤素酶的反应机制，Galli^[15] 和本文作者分别用 A 组酶 DM2 和 B 组酶 DM11 转化 CD₂Cl₂ 和 CD₂Br₂ (D=²H)，得到了二氘甲醛产物，这些实验证明细菌对卤化物的脱卤素反应采取亲核置换机制。

对各种二卤甲烷底物与酶和二硫化物阴离子模型系统的反应速度进行比较具有同样的意义。在表 2 中，CH₂Cl₂、CH₂Br₂ 和 CH₂Br Cl 与 HS⁻ 的反应速度的相对比值分别是 1.0, 28.9 和

40.2。DM11 脱卤素酶以上述三种物质为底物时，kcat/K_m 值的相对比值分别是 1.0, 4.4 和 5.7。两者趋势相同，但后者的变化幅度较小，这表明在与二氯甲烷的亲核反应中酶所起的作用远远大于二硫化物阴离子。酶催化反应的突出特点是它的接近效应，即它能增加各种辅底物在酶活性中心的有效摩尔浓度，从而把辅底物聚积在一起进行酶催化反应。一般认为，谷胱甘肽 S-转移酶通过接近效应，以及在中性 pH 条

件下谷胱甘肽硫氢基的去质子化并借此增加它的亲核性,催化酶反应^[4]。细菌脱卤素酶的 k_{cat}/K_m 值是大多数谷胱甘肽 S-转移酶的 10^4 倍。为了更好地了解细菌脱卤素酶具有高的二级反应速度常数的机制,需要做进一步研究,例如通过亲核标记和酶抑制实验揭示酶活性中心的氨基酸残基的性质^[4],目前,我们正在进行这类实验。

3 脱卤素细菌的遗传学

初期的二氯甲烷脱卤素细菌的研究主要集中在它的酶学方面,例如酶的分离纯化、动力学性质、反应机制和性质比较等^[6,7,11]。近年来,酶基因的研究受到重视,特别是甲基杆菌 (*Methylobacterium* sp) DM4 菌株和假单胞菌 DM11 菌株的二氯甲烷脱卤素酶基因的研究取得重要进展。

Galli 和 Leisinger^[16]证明,DM4 菌株含有 120kb、40kb 和 8kb 三种质粒,消除实验表明 120kb 质粒 pMBI511 与二氯甲烷代谢有关。他们从 DM4 菌株的总 DNA 中克隆到含有二氯甲烷脱卤素酶结构基因 *dcm A* 的 21kb Hind III 片段,该片段能与 DM4 菌株的总 DNA 杂交,但不与来自 DM4 菌株的纯化质粒和消除质粒的 DM4 菌株的总 DNA 杂交。这一结果表明:*dcm A* 基因可能位于 DM4 菌株的染色体上。*dcm A* 基因探针不与质粒消除菌株的染色体 DNA 杂交,是由于在消除质粒的过程中染色体出现部分缺失;或者 *dcm A* 基因位于一个没有被检测到的巨型质粒上。

La Roche 和 Leisinger^[17]对上述 21kb 的 Hind III 片段进行亚克隆,得到了含有 *dcm A* 基因及其两侧序列的 2.8kb Bam HI - Pst I 克隆片段。对该片段进行的核苷酸顺序分析表明,*dcm A* 基因的开放读码框编码 287 个氨基酸。用计算机对 *dcm A* 基因编码的氨基酸顺序与人、大鼠、玉米和蠕虫等真核生物的谷胱甘肽 S-转移酶的氨基酸顺序进行比较,发现它们具有三个高度保守的氨基酸区,其位置分别是 64—106, 171—182, 205—220。在谷胱甘肽 S-

转移酶的第一区中,77—93 之间的 17 肽是酶的 GSH 结合位点的一部分^[18],二氯甲烷脱卤素酶的 83 位精氨酸残基很可能是 GSH 的结合位点^[17]。由于上述氨基酸顺序的保守性,细菌的二氯甲烷脱卤素酶基因 *dcm A* 已被归入谷胱甘肽 S-转移酶超基因家族^[17]。

最近,DM11 菌株的二氯甲烷脱卤素酶的基因已被克隆和鉴定,核酸序列分析表明,该基因与 DM4 菌株的二氯甲烷脱卤素酶基因的同源性是 59%,与来自大鼠的 θ 类谷胱甘肽转移酶基因的同源性是 27%^[19]。并通过定点诱变技术改变了酶分子的某些氨基酸的种类,希望能得到稳定性好、底物范围广和比活力高的新酶 (Wackeet LP, 私人通信)。这些研究将为脱卤素细菌在废水处理中的应用奠定基础。

4 谷胱甘肽 S-转移酶超基因家族

谷胱甘肽 S-转移酶超基因家族包括 α 、 μ 、 π 和 θ 等四大类^[20]。在 θ 类中,有一种来自大鼠肝脏的小分子同工酶 5-5,该酶不能与 GSH 亲和柱结合,代谢二氯甲烷的活力比细菌脱卤素酶略高。此外,Blocki 和 Wackett 最近从大鼠肝脏中分离出另外一些同工酶,并检测到代谢二氯甲烷的活力^[4]。 α 类同工酶尚未检测到代谢二氯甲烷的活力。 μ 类同工酶 3-3、3-4 和 4-4 以二氯甲烷为底物时的比活力是 5—40 nmol/min/mg 蛋白,比细菌的二氯甲烷脱卤素酶和大鼠肝脏的同工酶 5-5 的活力低 100—1000 倍。

最近,关于猪肺 π 类谷胱甘肽 S-转移酶同工酶^[21]和大鼠肝脏谷胱甘肽 S-转移酶 μ 3-3^[22]的 X 射线晶质结构的研究,主要集中在阐明细菌二氯甲烷脱卤素酶和哺乳动物谷胱甘肽 S-转移酶之间的顺序同源性方面,以便了解这些酶决定二级和三级结构的氨基酸顺序。根据谷胱甘肽 S-转移酶 N-末端的一级结构和 Chou-Fasman 原理^[23]所推测的决定酶二级结构的氨基酸顺序见表 3。表 3 说明,细菌的 DM4 二氯甲烷脱卤素酶决定二级结构的氨基酸顺序与谷胱甘肽 S-转移酶是一致的。

表3 细菌DM4菌株二氯甲烷脱卤素酶和哺乳动物谷胱甘肽S-转移酶的二级结构决定因子的比较

谷胱甘肽S-转移酶	结构证明	决定二级结构的氨基酸顺序			参考文献
		β -片层	β -转角	α -螺旋	
猪 π	x-射线晶体结构	3-7	10-13	15-25	[19]
猪 π	Chou-Fasman 原理	2-8	10-13	13-27	[4]
大鼠肝3-3	x-射线晶体结构	—	—	14-24	[20]
大鼠肝3-3	Chou-Fasman 原理	2-7	8-11	15-34	[4]
细菌DM4	Chou-Fasman 原理	0-6	9-11	14-33	[4]

猪肺 π 类谷胱甘肽S-转移酶的N-末端对酶的GSH结合位点至关重要：在酶的10个GSH接触位点中，有3个位于开头的13个氨基酸中。 β -片层1末端的酪氨酸-7，在结合有谷胱甘肽的酶的半胱氨酰硫羟酸盐的氢键结合距离之内，而且几乎所有谷胱甘肽S-转移酶都是如此。位于第一个 α -螺旋N-末端的精氨酸-13，为GSH中 γ -谷氨酰基的 α -羧基提供了结合位点。猪肺 π 类谷胱甘肽S-转移酶的15—25氨基酸残基和同工酶3-3的14—24氨基酸残基决定酶的 α -螺旋，在该部位的一个螺旋形偶极使GSH的硫氢基(HS^-)附近出现静电场^[21,22]。

目前，来自人、大鼠、小鼠、猪、鸡、果蝇、家蝇、蠕虫、吸虫、玉米、小麦和酵母等多种生物的72种谷胱甘肽S-转移酶的氨基酸顺序都已测出，N-末端氨基酸顺序的大部分是谷胱甘肽的结合位点^[4]。对细菌二氯甲烷脱卤素酶和13种真核生物谷胱甘肽S-转移酶的30个N-末端氨基酸进行类似性计算性之后，得到图3^[24]。对酶的全顺序进行类似性比较，得到与图3类似的结果^[4]。正如Meyer^[20]所预期的那样，在 θ 家族中，细菌的二氯甲烷脱卤素酶与大鼠和果蝇的谷胱甘肽S-转移酶具有较高的类似性。

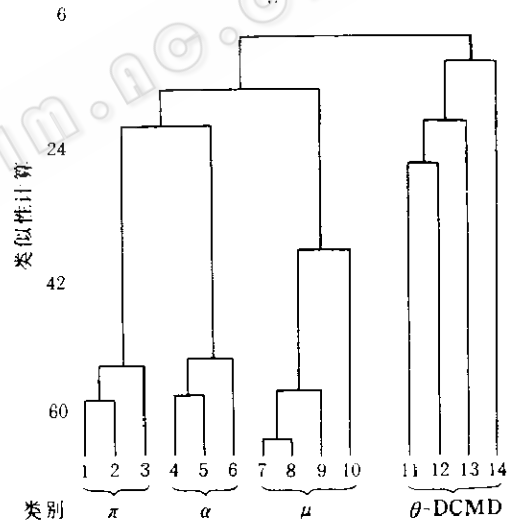


图3 二氯甲烷脱卤素酶(DCMD)和谷胱甘肽S-转移酶N-末端氨基酸顺序的同源性比较
注：被比较的氨基酸残基：谷胱甘肽S-转移酶为1—30，DCMD为14—43
1. 人 π 2. 大鼠 π 3. 猪 π 4. 鸡 π 5. 大鼠Y6-1
6. 人 α 7. 大鼠Y6-1 8. 小鼠 μ 9. 人 μ 10. 吸虫
11. DCMD 12. 大鼠 θ 13. 果蝇 θ 14. 小麦 θ

参 考 文 献

[1] Dean J A. Lange's Handbook of Chemistry (13th ed.).

McGraw-Hill book Co. New York, 1985, 7—290.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

- [2] Anders M W, Pohl L R. Halogenated alkanes. In: Anders M W (Ed) Bioactivation of Foreign Compounds, Halogenated Alkanes. New York: Academic Press, 1985. 283—315.
- [3] Mabey W, Mill T. J Phys Chem Ref Data, 1978, 7: 383—415.
- [4] Wackett L P, Logan M S P, Blocki F A *et al.* Biodegradation 1992, 3: 19—36.
- [5] Brunner W, Staub D, Leisinger T. Appl Environ Microbiol, 1980, 40: 950—958.
- [6] Kohler-Staub D, Leisinger T. J Bacteriol, 1985, 162: 676—681.
- [7] Scholtz R, Wackett L P, Egli C, *et al.* J Bacteriol, 1988, 170: 5698—5704.
- [8] Patel R N, Hou C T, Laskin A T, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1982, 44: 1130—1137.
- [9] Freedman D L, Gosset J M. Appl Environ Microbiol, 1991, 57: 2847—2857.
- [10] Stromeyer S A, Winkelbauer W, Kohler H, *et al.* Biodegradation 1991, 2: 129—137.
- [11] Kohler-Staub D, Hartmans S, Galli R, *et al.* J Gen Microbiol, 1986, 132: 2837—2843.
- [12] 蔡宝立, Wackett L P. 微生物学报, 1991, 31 (4): 321—324.
- [13] Ahmed, Anders. Drug Metab Dispo, 1976, 4: 357—361.
- [14] Blocki F A, *et al.* J Biol Chem, 1994, 269: 8826—8830.
- [15] Galli R, Stucki G & Leisinger T. Experientia 1982, 38: 1378.
- [16] Galli R, Leisinger T. J. Gen Microbiol, 1988, 134: 943—952.
- [17] La Roche S A, Leisinger T. J. Bacteriol., 1990, 172: 164—171.
- [18] Ketterer B, Meyer J, Clark A G. In Sies H & Ketterer B (ed.). Soluble glutathione transferase isozymes. London: Academic Press, Inc., 1988.
- [19] Bader R, Leisinger T. J Bacteriol. 1994, 176: 3466—3473.
- [20] Meyer D J, Coles B, Pemble S E, *et al.* Biochem J, 1991, 274: 409—414.
- [21] Reinemer P, Dirr H W, Ladenstein R, *et al.* EMBO J, 1991, 10: 1997—2005.
- [22] Liu S, Zhang P, Xinhua J, *et al.* J Bio Chem, 1992, 267: 4296—4299.
- [23] Chou P Y, Fasman G D. Ann Rev Biochem, 1978, 47: 251—276.
- [24] Smith R F, Smith T F. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 118—122.