

胺基裂解酶及其在医药中间体生产中的应用

何碧波 陈小龙 郑裕国* 沈寅初

(浙江工业大学生物工程研究所 杭州 310032)

摘要: C-N 裂解酶(E.C.4.3)是能催化释放氨、脒和胺基等并形成双键或环的一类酶。胺基裂解酶(E.C.4.3.3)就是其中能够催化释放胺基的一类酶,该类酶在医药中间体生产中起关键酶的作用。本文概述了 4 种胺基裂解酶的来源,酶学特性以及它们在医药中间体生产中的应用。

关键词: 胺基裂解酶, C-N 裂解酶, 井冈霉素, 单萜吲哚生物碱

Amine-lyases and Their Applications in Preparation of Pharmaceutical Intermediates

HE Bi-Bo CHEN Xiao-Long ZHENG Yu-Guo* SHEN Yin-Chu

(Institute of Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032)

Abstract: Carbon-nitrogen lyases (E.C.4.3) are a group of enzymes that release ammonia, amidine or amino group etc, and also show ability to form double bond or ring structure. Specifically, enzymes forming amino group are called amine-lyases (E.C.4.3.3), which are critical in the industrial production of many medicine intermediates. In this review is a summary of four major amine-lyases in terms of their source, enzymatic characteristics and their applications in preparation of pharmaceutical intermediates.

Keywords: Amine-lyases, C-N lyases, Validamycin, Monoterpenoid indole alkaloids

C-N 裂解酶属于裂解酶类中能裂解 C-N 键的酶,包括:解氨酶(EC 4.3.1 Ammonia-lyases),脒裂解酶(EC 4.3.2 Amidine-lyases),胺基裂解酶(EC 4.3.3 Amine-lyases),其它 C-N 裂解酶(EC 4.3.99 Other Carbon-nitrogen lyases)。其中胺基裂解酶又分为:3-酮-井冈羟胺 A C-N 裂解酶(3-Ketovalidoxylamine A C-N lyase)、异胡豆苷合酶(strictosidine synthase)、Deacetylisoipecoside 合成酶和 Deacetylpecoside 合成酶。这些酶能催化反应生成很多重要的药用中间体,是很多抗癌药物合成途径中最主要的关键酶,所以对这一类酶的研究有非常重要的社

会意义和经济意义。目前,国外对该类酶的研究开展的比较多,而国内对此类酶的相关报告还极少。本文综述了该类酶的性质及在医药中间体生产中的应用,为该类酶的研究和应用打下基础。

1 3-酮-井冈羟胺 A C-N 裂解酶

3-酮-井冈羟胺 A C-N 裂解酶[EC 4.3.3.1]又称 3-酮-井冈羟胺 C-N 裂解酶,系统名为 4-硝基苯-3-酮-井冈霉素 4-硝基苯胺裂解酶。该酶催化的反应式如图 1。

此酶最早由日本科学家 Takeuchi 等于 1984 年

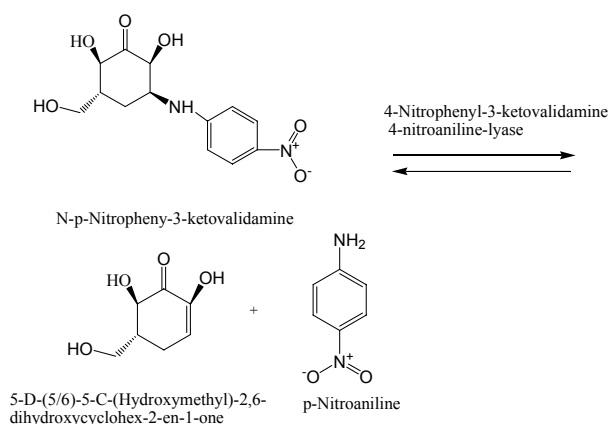


图1 3-酮-井冈羟胺 A C-N 裂解酶的催化反应

Fig. 1 The reaction catalyzed by 3-ketovalidoxylamine A C-N lyase

在菌株 *Flavobacterium saccharophilum* 中首次发现^[1]。我们实验室从土壤中筛选到一株能在以井冈霉素A为唯一碳源的培养基上生长的菌株嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia* ZJB-041)也具有胺基C-N裂解酶活性^[2]。从 *F. saccharophilum* 中分离得到的 3-酮-井冈羟胺 A C-N裂解酶是一个单亚基蛋白, 分子量为 36 kD, 等电点为 10.5, 最适反应pH为 9.0。酶活性受EDTA和EGTA的抑制, 而在 Ca^{2+} 存在的条件下, 酶活性又会恢复, 说明此酶是钙型的金属酶。此外, 在 MnCl_2 和 LaCl_3 (1 mmol/L) 存在下, 酶活性下降为原来的 7.2% 和 2.6%, 说明这两种金属离子对 3-酮-井冈羟胺 A C-N裂解酶的抑制非常明显。此外, SrCl_2 、 ZnSO_4 和 CoCl_2 也能抑制

此酶的部分活性, 而 MgCl_2 和 HgCl_2 几乎不存在抑制作用。此后研究发现, 该酶对对硝基苯-3-酮-井冈霉素和对硝基苯- α -D-3-酮葡萄糖苷的表现 K_m 分别为 0.24 mmol/L 和 0.15 mmol/L^[3]。之前, 底物的合成都用的是化学法, 最近, 张建芬等用细胞转化法制成了底物N-对硝基苯-3-酮基井冈胺, 转化率达到了 68%, 这在底物合成上是一个新的突破^[4]。Takeuchi 和张建芬研究发现, 井冈霉素A在细菌体内的催化过程为, 先是通过 β -糖苷酶脱去一个葡萄糖, 生成井冈羟胺A(validoxylamine A), 然后再通过葡萄糖-3-脱氢酶作用生成 3-酮井冈羟胺A, 最后在C-N裂解酶的作用下生成井冈霉素烯胺(valienamine)和井冈霉素胺(validamine)。这说明两种菌株转化井冈霉素A的途径是一样的^[1]。张建芬等研究的菌株 *Stenotrophomonas maltophilia* ZJB-041 产生的裂解酶由于蛋白质的N端封闭, 无法测定N端氨基酸序列, 而 *F. saccharophilum* 产生的裂解酶只得到了氨基酸组成, 同样也没有得到氨基酸序列。

井冈霉素的酶解产物为井冈羟胺A(validoxylamine A)、井冈霉素烯胺(valienamine)、井冈霉素胺(validamine)和其他环醇类化合物。井冈霉素烯胺和井冈霉素胺对麦芽糖酶、蔗糖酶等 α -糖苷酶具有很强的抑制性^[5,6]。很多糖苷酶抑制剂类降糖药, 如阿卡波糖(acarbose)、伏格列波糖(voglibose)等均含有井冈霉素烯胺的相同结构(图2)。它们都可以以井冈霉素烯胺

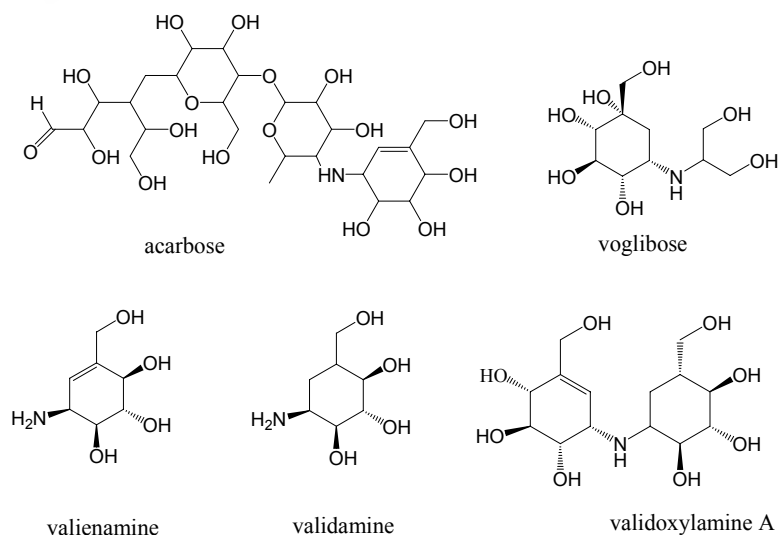


图2 阿卡波糖、伏格列波糖、井冈霉素烯胺、井冈霉素胺、井冈羟胺 A 结构式

Fig. 2 The chemical structure of acarbose, voglibose, valienamine, validamine and validoxylamine A

为母体来进行化学合成。因此井冈霉素胺是重要的糖苷酶抑制剂, 是合成其它新糖苷酶抑制剂类降糖药的重要医药中间体。研究井冈霉素的酶解过程, 对于井冈霉素胺的大规模生产具有指导意义。提高井冈霉素的经济效益, 有助于实现生物农药向生物医药的转变。

2 异胡豆苷合酶

异胡豆苷合酶[EC.4.3.3.2], 系统名为 3- α (S)-异胡豆苷色胺-裂解酶, 它以 Pictet-Spengler 缩合反应为机制催化裂环马钱子的乙醛基和色胺的胺基之间的反应, 生成异胡豆苷, 是合成单萜吲哚生物碱的关键酶^[7]。其酶解反应式如图 3 所示。

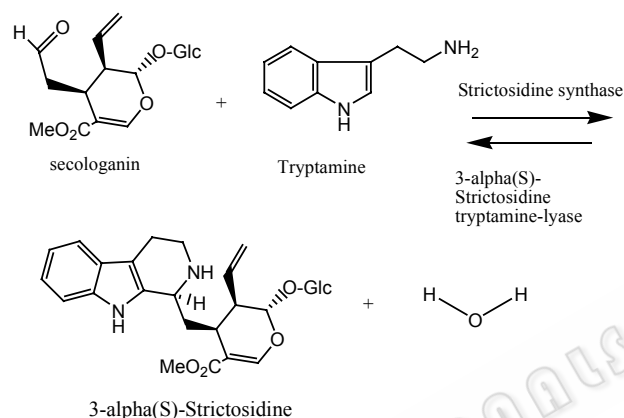


图 3 异胡豆苷合酶的催化反应

Fig. 3 The reaction catalyzed by strictosidine synthase

该酶最早由 Treimer JF 和 Zenk MH 于 1979 年从马达加斯加的一种植物长春花 [*Catharanthus roseus*] 的蛋白质中分离得到^[8]。由该酶催化合成的异胡豆苷是合成长春碱和长春新碱的主要中间体^[9](图 4)。而长春碱和长春新碱具有良好的抗肿瘤作用^[9]。Treimer JF 和 Zenk MH 得到的酶分子量为 34 kD, 酶反应最佳 pH 为 6.8。裂环马钱子和色胺的 K_m 值分别为 3.4 mmol/L 和 2.3 mmol/L。1990 年, Pasquali G 等人首次得到了该酶的氨基酸序列, 发现此酶有 352 个氨基酸残基组成, 其催化活性为第 155 氨基酸残基到 245 氨基酸残基^[10]。1995 年 Anthony De Wall 等发现从长春花中得到的异胡豆苷合酶有 6 种不同的同工酶^[11], 分别为 A1、A2、B、C1、C2 和 D, 经过分离纯化后发现 6 种酶都为糖蛋白, 如表 1, 它们的动力学参数没有显著的差别, 分子量从 35 kD~37 kD 不等。

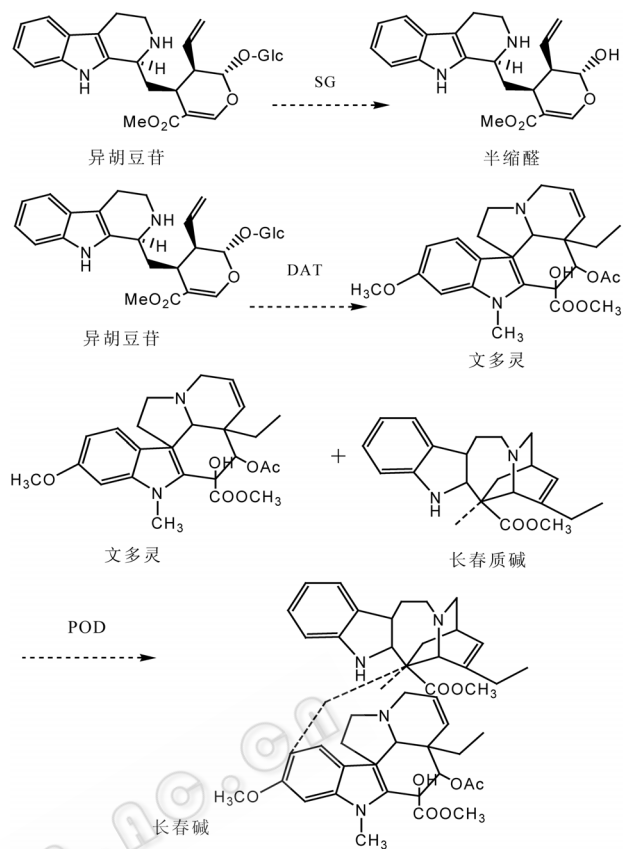


图 4 长春碱生物合成的关键步骤

Fig. 4 The key step of vinblastine biosynthesis

注: SG: 异胡豆苷 β -糖苷酶; DAT: 脱乙酰氧文多灵羟化酶; POD: 过氧化物酶

表 1 异胡豆苷合酶同工酶的动力学参数
Table 1 Estimates of kinetic parameters of strictosidine synthase from reaction progress curves

Isoform	V_{max} (nkat/mg)	K_m tryptamine (μ m)	K_p (μ m)
A1	215 \pm 3	8.7 \pm 0.6	260 \pm 34
A2	238 \pm 14	8.2 \pm 0.9	442 \pm 145
B	312 \pm 3	9.2 \pm 0.3	261 \pm 14
C1	303 \pm 11	9.3 \pm 1.1	325 \pm 33
C2	153 \pm 15	8.4 \pm 2.6	248 \pm 56
D	180 \pm 2	9.4 \pm 1.1	316 \pm 33
Average of all	234 \pm 64	8.9 \pm 0.5	309 \pm 73

1990 年, 美国科学家 McKnight 等制作了 strictosidine synthase 的 cDNA 文库^[12], 为后来的研究带来了很大的便利。在此研究基础上, 后面的研究者对表达该酶的基因进行了全面的研究, 包括各种启动子、促进子、酶的诱导以及该酶基因在大肠杆菌等细菌中的表达^[13-16]。2004 年, Dutta 等阐明了单萜吲哚生物碱的生物合成途径^[17](图 5)。

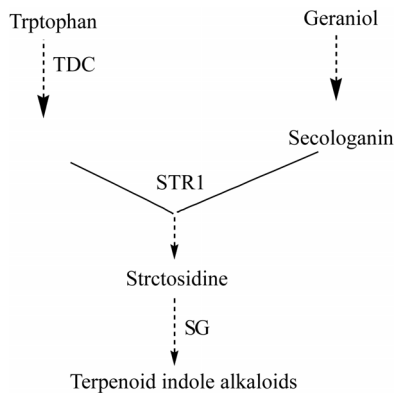


图 5 单萜吲哚生物碱的生物合成途径

Fig. 5 The biosynthesis pathway of terpenoid indole alkaloids biosynthesis

注: STR1: 异胡豆萜合酶; SG: 异胡豆萜-糖苷酶; TDC: 色氨酸脱羧酶

同年德国科学家 Barleben 等利用 *Escherichia coli* 成功表达了 SG, 并纯化得到了毫克级的纯酶, 利用智能筛选技术得到的晶体适合 X-射线衍射分析, 然后利用悬滴技术进行晶体培养, 初步了解了该酶的结构和功能的关系^[18]。

2006 年 Elizabeth 等研究了 STR1 的底物特异性。他用了 21 种色胺类似物和 4 种裂环马钱子类似物 (图 7 为异胡豆萜合酶能催化的几种底物) 为底物, 考察了异胡豆萜合酶底物的动力学参数 (表 2)。通过比较 K_m 值和 K_{cat}/K_m 值, 研究者发现, 天然底物色胺 (底物 1) 为最适底物, 催化效率也是最高的, 实验中没有找到比天然底物更适合的其它底物^[19]。

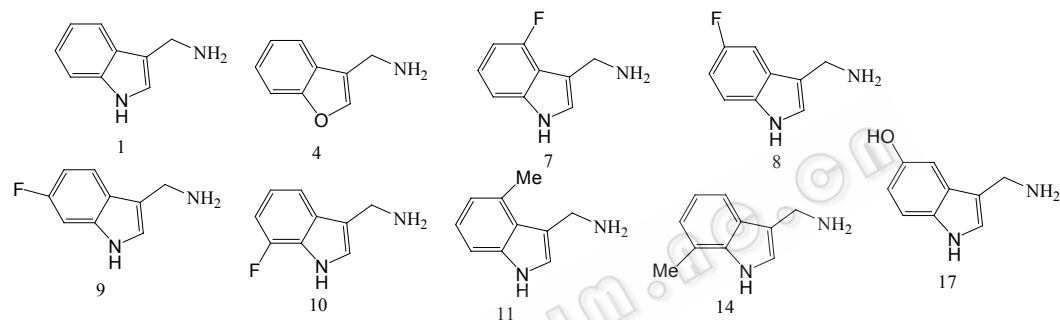


图 6 实验用的异胡豆萜合酶底物

Fig. 6 Substrates tested with strictosidine synthase

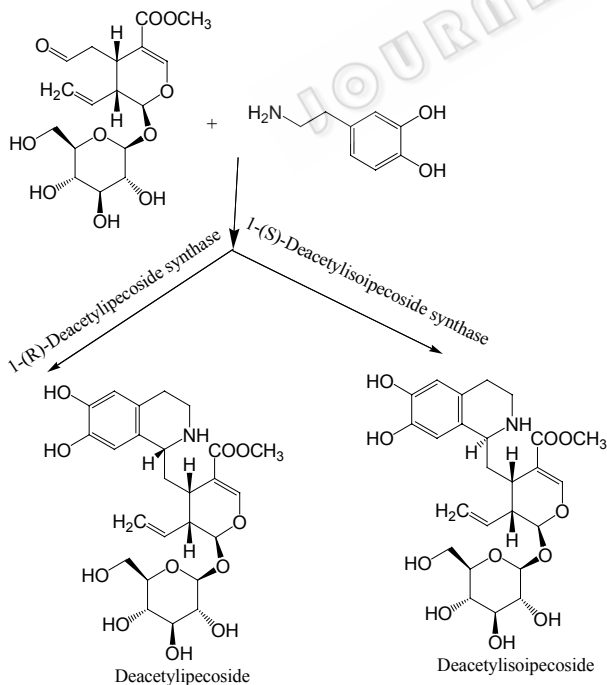


图 7 Deacetylisopecoside 合成酶和 Deacetylisopecoside 合成酶的反应

Fig. 7 The reaction catalyzed by deacetylisopecoside synthase and deacetylisopecoside synthase

表 2 异胡豆萜合酶不同底物的动力学参数			
Table 2 Kinetic parameters for the strictosidine synthase substrates			
Substrate	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	K_{cat} (min^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{S}\cdot\text{L}/\text{mol}$)
1	7.4	0.9	2030.0
4	7.7	0.023	50.0
7	42.0	0.35	139.0
8	7.5	0.043	101.0
9	8.9	0.056	105.0
10	13.0	0.11	141.0
11	80.0	0.19	40.0
14	198.0	0.29	24.0
15	1200.0	0.096	1.3

关于异胡豆萜合酶的结构分析正在研究当中, 相信不久的将来能得到该酶的结晶酶, 进而研究该酶的三维结构。

抗肿瘤作用是长春花生物碱的主要作用, 国内外发表了大量的关于其抗肿瘤应用的报道。其中长春碱主要用于治疗何杰金氏病和绒毛上皮癌^[9], 对何杰金氏病治疗的有效率为 68%, 完全缓解率为 30%, 对淋巴肉瘤、黑色素瘤、卵巢癌、白血病等也

有一定疗效。长春新碱主要用于治疗急性淋巴细胞白血病, 同时也可用于治疗食管癌、睾丸内胚瘤、血小板减少性紫癜及难治性多发性骨髓瘤等。研究表明从长春花中分离出的总生物碱的一部分 AC2875 对小鼠艾氏腹水癌和腹水型肝癌均有明显的抑制作用, 对大鼠腹水型吉田肉瘤有较好的疗效, 但对动物实体肿瘤则无抑制作用^[20]。从长春花中分得的 catharanthamine 在 P338 白血病试验体系体内试验中显示了明显的活性^[21]。

3 Deacetyloisopicoside 合成酶和 Deacetyloisopicoside 合成酶

Deacetyloisopicoside 合成酶[EC.4.3.3.3]和 Deacetyloisopicoside 合成酶[EC.4.3.3.4] 这两个酶最早是 De Eknankul W 等人从热带植物 *Alangium lamarckii* Thw 叶子中提取出来的, 通过 Pictet-Spengler 反应把多巴胺和裂环马钱子在 pH 7.5 下缩合成差向异构体: (1R)-deacetyloisopicoside 和 (1S)-deacetyloisopicoside^[22](图 6)。它们是该植物中合成生物碱和含氮配糖体的前体。所以, 该反应表明植物中生物碱和含氮配糖体自发形成 S 和 D 构形是由这两个酶所决定的。目前, 对于该两个酶的报道还很少。但由于其在手性药物中的应用价值, 对该酶的研究将会更加深入。

4 展望

对于井冈霉素 A 酶解过程中的关键酶进行分离纯化, 并研究其酶学性质, 测定该酶蛋白的氨基酸序列, 能为以后对该酶的定向进化打下基础, 对井冈霉素胺的大规模生产具有指导意义, 有助于实现生物农药向生物医药的转变。

单萜吲哚生物碱合成途径中一些关键酶的基因分离、克隆和分子水平的调控研究, 为细胞悬浮培养生产单萜吲哚生物碱及其衍生物的工业化带来了新的希望。然而, 微生物和植物的次生代谢都由许多酶共同催化完成, 受多种因素制约, 目前, 单萜吲哚生物碱的合成途径中有些关键酶还没有得到结晶酶, 各种构型也没有完全阐明, 所以还需要进一步的研究。植物次生代谢的后生物合成机制的研究, 对于应用代谢工程的策略调节代谢流量, 使代谢产物向期望的方向进行至关重要。很明显, 在植物细

胞培养过程中, 对抑制降解的任何操作都将导致有用代谢产物的大量积累, 而且还可以有效地降低下游过程的提取成本。因此阐明单萜吲哚生物碱合成途径中各种酶的特征及其编码的基因, 将是定向调控单萜吲哚生物碱生产的关键^[23]。

参考文献

- [1] Asano N, Takeuchi M, Ninomiya K. Microbial degradation of validamycin A by *Flavobacterium Saccharophilum* enzyme cleavage of C-N linkage in Validoxylamine A. *J Antibiot*, 1984, **37**(8): 859–867.
- [2] Wang YS, Zheng YG, Shen YC. Isolation and identification of novel valienamine-producing bacterium. *Appl Microbiol*, 2007, **102**(3): 838–844.
- [3] Takeuchi M, Asano N, Kameda Y. Purification of 3-ketovalidoxylamine A C-N lyase from *Flavobacterium saccharophilum*. *J Biochem*, 1985, **98**(6): 1631–1638.
- [4] Zhang JF, Zheng YG, Liu ZQ. Preparation of 3-ketovalidoxylamine A C-N lyase substrate: N-p-nitrophenyl-3-ketovalidamine by *Stenotrophomonas maltophilia* CCTCC M 204024. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **73**(6): 1275–1281.
- [5] Kameda Y, Asano N, Yoshikawa M, et al. Valienamine as an α -glucosidase inhibition. *J Antibiot*, 1980, **33**(12): 1575–1576.
- [6] Kameda Y, Asano N, Yoshikawa M, et al. Valiolamine, a new α -glucosidase inhibiting aminocyclitol produced by *Streptomyces hygroscopicus*. *J Antibiot*, 1984, **37**(11): 1301–1307.
- [7] Treimer JK, Zenk MH. Purification and properties of strictosidine synthase, the key enzyme in indole alkaloid formation. *Eur J Biochem*, 1979, **101**(1): 225–233.
- [8] Kutney JP, Botta B, Boulet GA. Alkaloid production in *Catharanthus roseus*(L.) Gdon cell cultures. X VI. Bio-transformation of 3',4'-anhydrovinblastine with *Catharanthus roseus* cell cultures and enzyme systems. *Heterocycles*, 1988, **27**(3): 629–637.
- [9] Neuss N, Neuss MN. The therapeutic use of bisindole alkaloids from *Catharanthus roseus*. In the alkaloids. *Genet Eng*, 1990, **37**(3): 229–239.
- [10] Pasquali G, Goddijn OJ, de Waal A, et al. Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. *Plant Mol Biol*, 1992, **18**(6): 1121–1131.
- [11] de waal A, Meijer AH, Verpoorte R. Strictosidine synthase from *Catharanthus roseus*: purification and characterization of multiple forms. *Biochem J*, 1995, **306**(2): 571–580.
- [12] Mcknight TD, Roessner CA, Devagupta R. Nucleotide sequence of a cDNA encoding the vacuolar protein stric-

- tosidine synthase from *Catharanthus roseus*. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**(16): 4939–4939.
- [13] van der Fits L, Memelink J. The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element. *Plant J*, 2001, **25**(1): 43–53.
- [14] Pauw B, Hilliou FAO, Martin VS. Zinc finger proteins act as transcriptional repressors of alkaloid biosynthesis genes in *Catharanthus roseus*. *J Biol Chem*, 2004, **279**(51): 52940–52948.
- [15] Pasquali G, Erven ASW, Ouwerkerk PBF. The promoter of the strictosidine synthase gene from periwinkle confers elicitor-inducible expression in transgenic tobacco and binds nuclear factors GT-1 and GBF. *Plant Mol Biol*, 1999, **39**(2): 1299–1310.
- [16] Raynal M, Guilleminot J, Gueguen C. Structure, organization and expression of two closely related novel *Lea*(late-embryogenesis-abundant) genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 1999, **40**(1): 153–165.
- [17] Dutta A, Batra J, Pandey-Rai S. Expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic pathway genes corresponds to accumulation of related alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Planta*, 2005, **220**(3): 376–383.
- [18] Xueyan M, Juergen K, Gqnter F. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of strictosidine synthase from *Rauvolfia*: the first member of a novel enzyme family. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1702**(1): 121–124.
- [19] McCoy E, Galan MC, O'Connor SE. Substrate specificity of strictosidine synthase. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, **16**(9): 2475–2478.
- [20] Yin J, Guo LG. Modern research and clinical application of traditional Chinese medicine. *Genet Eng*, 1994, **17**(3): 127–133.
- [21] Svoboda GH. A note on several new alkaloids from *Vinca rosea* Linn. I. Leurosine, virosine, perivine. *Am Pharm Assoc*, 1958, **47**(11): 834.
- [22] DeEknukul W, Ounaroorn A, Tanahashi T. Enzymatic condensation of dopamine and secologanin by cell-free extracts of *Alangium lamarkii*. *Phytochemistry*, 1997, **45**(3): 477–484.
- [23] Mark JL, Kathy M, Didier H. Expression of two consecutive genes of a secondary metabolic pathway in transgenic tobacco: molecular diversity influences levels of expression and product accumulation. *Plant Mol Biol*, 1998, **38**(5): 765–774.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名：菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写，其余小写，属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体，首字母大写。

限制性内切酶：前3个字母用斜体，后面的字母和编码正体平排，例如：*Bam*H、*Eco*R、*Msp*、*Sau*3A等。

氨基酸和碱基的缩写：氨基酸缩写用3个字母表示时，仅第一个字母大写，其余小写，正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体，蛋白质符号首字母大写，用正体。