

# 芳香烃分解代谢的龙胆酸途径\*

高晓莉 周宁一\*\*

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

**摘要:** 龙胆酸代谢途径是微生物降解芳香烃的 3 条典型的代谢途径之一,是一条重要但需要深入研究的代谢途径。综述了龙胆酸代谢途径的研究进展,特别是分子生物学方面的成果。

**关键词:** 芳香烃代谢, 龙胆酸途径, 基因克隆

**中图分类号:** Q935      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654 (2003) 03-0081-05

## GENTISATE PATHWAY IN AROMATIC CATABOLISM

GAO Xiao-Li ZHOU Ning-Yi

(*Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071*)

**Abstract:** Gentisate (2, 5-dihydroxybenzoate) pathway is one of three typical routes for bacterial aromatic catabolism. Although it is less common than either of the extensively studied pathways through catechols, the gentisate pathway also plays an important role in bacterial aromatic catabolism. This article reviews recent developments of this pathway, both in biochemistry and molecular biology.

**Key words:** Aromatic catabolism, Gentisate pathway, Gene cloning

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30170036)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.30170036)

中国科学院“百人计划”项目

\*\* 联系人

收稿日期: 2002-05-10, 修回日期: 2002-07-28

微生物分解代谢芳香烃化合物不但是自然界碳循环的一个基本环节,而且对于泄漏至环境中的外源物质(xenobiotics)的生物降解起着重要作用。微生物在好氧条件下降解芳香族化合物的途径可以概括为以下几个步骤:(1)初始代谢反应:加氧酶作用于苯环上产生具有二羟基的中间产物使之成为开环步骤的底物;(2)苯环裂解反应:在开环步骤中加氧至环上产生不饱和的直链脂肪酸。后继的代谢步骤大都按照较为通常方式产生一些进入中心代谢(TCA循环)的化合物(如:丙酮酸,乙酰辅酶A,琥珀酸等)。

## 1 微生物分解芳香烃化合物的3条主要途径

在过去的几十年中,科学家们对于需氧细菌中由苯环转变为代谢物的两条主要途径的生物化学和分子生物学已作了大量的研究。一条途径是由邻苯二酚2,3-双加氧酶起始反应的,即间位裂解途径。大部份工作来自于英国 Bangor 的 Williams 教授实验室对 TOL 质粒 pWW0 上的 *xyl* 一组基因的研究<sup>[1]</sup>。另一条途径是由邻苯二酚1,2-双加氧酶起始反应的,即邻位裂解途径。大部份工作来自于美国 Yale 的 Ornston 教授实验室的贡献<sup>[2]</sup>。然而,尽管对于通过龙胆酸(2,5-二羟基苯甲酸)的第3条主要代谢途径已在40年前有了报道<sup>[3]</sup>,并且发现许多属的细菌通过该途径分解代谢多种芳香烃化合物,但是对该途径的生物化学,尤其是分子生物学研究甚少。而在文献和专著中却又将其作为主要代谢途径之一和前两条一起加以描述和讨论。由此可见;龙胆酸途径是微生物分解代谢芳香烃化合物过程中一条重要而又需要深入研究的代谢途径。

## 2 龙胆酸途径的早期研究

早在1957年, Tanaka<sup>[4]</sup>在一种假单胞菌中发现反丁烯二酸-单酰丙酮酸(Fumarylpyruvate)为龙胆酸降解的中间产物。1959年 Lack<sup>[3]</sup>在一种能利用龙胆酸为唯一碳源生长的假单胞菌细胞提取液中鉴定出顺丁烯二酸-单酰丙酮酸(Maleylpyruvate)为代谢的中间产物,并在GSH(还原型谷胱甘肽)的辅助下,最终产生丙酮酸和反丁烯二酸。结合 Tanaka 的工作, Lack 初步确立龙胆酸途径,即龙胆酸开环裂解后产生顺丁烯二酸-单酰丙酮酸,并在GSH的协同作用下,顺丁烯二酸-单酰丙酮酸可以异构为反丁烯二酸-单酰丙酮酸,再水解为丙酮酸和反丁烯二酸,继而进入TCA循环。

由于龙胆酸代谢依次产生的中间产物具有光吸收特征:龙胆酸,顺丁烯二酸-单酰丙酮酸,反丁烯二酸-单酰丙酮酸分别在320nm, 330nm, 340nm处有最大特征吸收峰。Lack在1961年初步建立了龙胆酸代谢途径中酶学分析方法<sup>[5]</sup>。通过简单的纯化手段获取细胞裂解液中的粗提酶,利用分光光度法观察特征峰的产生或消失情况,并依次鉴定出顺丁烯二酸-单酰丙酮酸异构酶和反丁烯二酸-单酰丙酮酸水解酶的活性。1975年, Crawford<sup>[6]</sup>纯化并鉴定了龙胆酸代谢途径中作为开环酶的龙胆酸1,2-双加氧酶。至此,以分光光度法为基础的酶学分析方法已确立,并为以后的研究工作奠定了基础。

## 3 龙胆酸代谢的3条途径

后来陆续有人发现许多微生物对多种芳香烃化合物代谢通过这条途径,包括假单胞菌属对2,5-二甲基酚,间或对甲基酚;一些杆菌对苯甲酸,3-或4-羟基苯甲酸,3-氯代苯甲酸,5-氯代水杨酸;某些球菌对萘,邻二甲苯;拟无枝酸菌属和链霉菌对苯甲酸;酵母菌和一些真菌对苯酚和苯甲酸;埃文固氮弧菌对苯甲酸的代谢等。进一步的

研究发现龙胆酸开环成为顺丁烯二酸-单酰丙酮酸后,其后续代谢有3条不同的途径。在水解酶的作用下,直接分解成顺丁烯二酸和丙酮酸,顺丁烯二酸再氧化成苹果酸<sup>[7-9]</sup>;顺丁烯二酸-单酰丙酮酸异构酶在依赖于GSH的存在下,将其异构成反丁烯二酸-单酰丙酮酸,反丁烯二酸-单酰丙酮酸再在水解酶的水解作用下,形成反丁烯二酸和丙酮酸<sup>[5,10,11]</sup>;顺丁烯二酸-单酰丙酮酸异构酶在不依赖于GSH的存在下,完成如第二种方式的异构分解<sup>[10,12]</sup>。

为了快速有效的区别后两种代谢途径,1977年,Crawford发明了用NEM(N-乙基顺丁烯二酰亚胺)鉴定法来检测顺丁烯二酸-单酰丙酮酸异构酶是否依赖于GSH<sup>[10]</sup>。NEM可以抑制GSH中的活泼巯基,从而抑制依赖于GSH的顺丁烯二酸-单酰丙酮酸异构酶活性,如果再加入过量的GSH则可以恢复此酶的活性。而不依赖于GSH的异构酶的活性则不受NEM的影响。

1985年,Hagedorn用此方法鉴定和比较了来自5个不同属的十几种革兰氏阳性菌和阴性菌的顺丁烯二酸-单酰丙酮酸异构酶,除了*Pseudomonas alcaligenes* 25X(革兰氏阴性菌,它的代谢方式兼有顺丁烯二酸-单酰丙酮酸直接分解和依赖于GSH的异构分解两种代谢途径)的情况比较复杂外,其它的革兰氏阴性菌均是依赖于GSH的,而革兰氏阳性菌均是不依赖于GSH的<sup>[12]</sup>。在后来陆续发现的菌株中,也证实了这个结论。

#### 4 龙胆酸 1,2-双加氧酶(GDO)的特性研究

龙胆酸 1,2-双加氧酶(GDO)是龙胆酸代谢途径中的第一个酶,是一个重要的开环酶。虽然GDO发现的时间也较早,但与两条邻苯二酚途径的开环酶相比,对其研究很少。

迄今为止只有为数不多的菌株中的GDO纯化过<sup>[6,13-16]</sup>,其中来自6株菌GDO的N末端已测序<sup>[13-16]</sup>。它们大多以四聚体的形式存在,少数是二聚体;加入Fe<sup>2+</sup>对其稳定性有很大的提高,说明Fe<sup>2+</sup>是其所依赖的辅基;反应过程需氧;其温度、pH值的影响,等电点,以龙胆酸为底物的动力学常数等参数的比较见表1。

表1 不同菌株中的GDO特性比较

特性	<i>M. osloensis</i> <sup>[6]</sup>	<i>P. testosteroni</i> <sup>[15]</sup>	<i>P. acidovorans</i> <sup>[15]</sup>	<i>K. pneumoniae</i> <sup>[18]</sup>	<i>P. alcaligenes</i> P25X <sup>[13]</sup>	<i>P. putida</i> P35X <sup>[13]</sup>
全酶分子量(kD)	154	158 ± 5	164 ± 5	159 ± 6	154 ± 6	82 ± 4
亚基分子量(kD)	40	40.8 ± 1	37.2 ~ 39.8 ± 1	38 ± 2	39 ± 1	41 ± 1
结构	四聚体	四聚体	四聚体	四聚体	四聚体	二聚体
最适pH	7.0 ~ 8.5	7.0 ~ 9.0	7.0 ~ 9.0	8.0 ~ 9.0	7.5 ~ 9.5	7.5 ~ 9.5
pH稳定范围	NA	6.0 ~ 8.0	6.0 ~ 8.0	6.0 ~ 11.0	5.0 ~ 7.5	7.0 ~ 9.0
最适温度(°C)	NA	NA	NA	30	50	50
温度稳定范围(°C)	NA	NA	NA	NA	高于30	高于40
等电点	NA	5.7 ~ 6.0	4.6 ~ 4.8	4.7 ~ 5.0	4.8 ~ 5.0	4.6 ~ 4.8
K <sub>m</sub> (μM)	7.1	85	74	52	92	143

注:NA代表未知。此表据文献[13]修改

#### 5 顺丁烯二酸-单酰丙酮酸异构酶和水解酶的特性研究

唯一被纯化的顺丁烯二酸-单酰丙酮酸异构酶来自肺炎克氏杆菌M5a1,其分子量的大小为30 ± 2kD,并且其N末端已测序<sup>[11]</sup>。GSH对于一些顺丁烯二酸-单酰丙酮酸异构酶的活性存在是必不可少的,推测其与异构作用中巯基上的质子交换和氨基酸的转运

有关<sup>[12]</sup>水解酶至今没有有关纯化的报道。

## 6 GDO 基因的研究

对 GDO 基因克隆表达和功能鉴定直到近几年才有报道<sup>[14,16,17,19]</sup>, 这使体外研究 GDO 成为可能。已完成对编码 GDO 的基因测序, 并进行 GDO 功能鉴定的 4 个菌株为: *Sphingomonas* sp. RW5<sup>[16]</sup>, *Ralstonia* sp. U2<sup>[19]</sup>, *Pseudomonas alkaligenes* sp. 25X<sup>[17]</sup>, *Haloferax* sp. D1227<sup>[14]</sup>。它们氨基酸序列的同源性比较得出, 其同源性范围在 31% ~ 47%。它们之间的低同源性, 表明龙胆酸代谢途径的来源差异很大, 可能是为适应苯环上不同取代基的选择结果。

对编码 GDO 的基因进行测序和分析对于研究 GDO 的机理有所帮助<sup>[17]</sup>。通过对已知的几个 GDO 的氨基酸序列同源性比较得出的保守核心区域, 与随机突变和定点突变得到的近 300 个突变株的 GDO 活性进行对照分析, 来说明这些高度保守核心序列对酶活的影响。证实了此核心序列与辅基  $Fe^{2+}$  的加入, 亚基间的连接和形成具有功能性的全酶等密切相关。

## 7 整个代谢途径所有基因的克隆和表达

目前唯一对龙胆酸途径在分子生物学水平完整的研究结果来自于本文通讯作者等在 2001 年初对 *Ralstonia* sp. U2 菌株相关基因和酶的报道<sup>[19]</sup>。U2 菌株能以萘作为唯一碳源和能源生长, 将萘分解代谢至水杨酸后, 在水杨酸 5-单加氧酶<sup>[20]</sup>的作用下生成龙胆酸, 并进入龙胆酸途径。编码代谢萘的所有基因已被克隆, 其中参与龙胆酸途径的 3 个酶的基因 (*nagIKL*) 已被做了功能鉴定。这是目前唯一的龙胆酸途径分子生物学的研究, 这些基因也是基因库中唯一经过功能鉴定的参与龙胆酸代谢的系列基因。因此有必要研究其它菌株参与龙胆酸代谢的基因和酶, 来比较基因的同源性及其相关代谢途径的差异性, 从而丰富对这条代谢途径的认识。

我们目前正在从事通过龙胆酸途径的 3-羟基苯甲酸代谢的分子生物学研究 (国家自然科学基金项目), 已将在肺炎克氏杆菌 M5a1 中编码代谢 3-羟基苯甲酸至丙酮酸和反丁烯二酸酶的基因定位于 8kb 的 DNA 片段上。其中 4 个编码降解酶的基因分别被克隆至高通量表达载体 pET5a 和 pET28a (his-tagged) 中, 它们都得了高效表达并具有相应的酶活。这些酶能在体外将 3-羟基苯甲酸按顺序转化成龙胆酸, 顺丁烯二酸-单酰丙酮酸, 反丁烯二酸-单酰丙酮酸, 最后生成丙酮酸和反丁烯二酸。对该片段上的基因测序分析表达是首次在分子生物学水平上研究 3-羟基苯甲酸 6-单加氧酶, 并成为第二例龙胆酸代谢途径的分子生物学研究。

## 参 考 文 献

- [1] Sala-Trepat J M, Evans W C. *Eur J Biochem*, 1971, **20**: 400 ~ 413.
- [2] Stanier R Y, Ornston L N. *Adv Microb Physiol*, 1973, **9**: 89 ~ 151.
- [3] Lack L. *Biochimica et Biophysica acta*, 1959, **34**: 117 ~ 123.
- [4] Tanaka H S, Sugiyama K, Yano K, *et al.* *Agr Chem Soc Jpn Bull*, 1957, **21**: 67 ~ 68.
- [5] Lack L. *J Biol Chem*, 1961, **236** (11): 2835 ~ 2840.
- [6] Crawford R L, Hutton S W, Chapman P J. *J Bacteriol*, 1975, **121** (3): 794 ~ 799.
- [7] Bayly R, Chapman P, Dagley S, *et al.* *J Bacteriol*, 1980, **143** (1): 70 ~ 77.
- [8] Hopper D J, Chapman P J, Dagley S. *J Biochem*, 1968, **110**: 79.