

吡咯喹啉醌的生物合成及其应用

曹志方 王银善

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

70年代以前,发现有的细菌甲醇脱氢酶(MDH)辅基的某些性质与喋啶的相似,猜测其是一种喋啶衍生物。直到1979年,Salisbury等^[1]采用X-射线衍射技术,分析了假单胞菌(*Pseudomonas. sp.*)TPI MDH辅基的丙酮加成物晶体结构,才首次阐明该辅基的分子结构,并命名为吡咯喹啉醌(Pyrro-loquinoline quinone, 简称PQQ)。这是第一次报道邻位醌类化合物可作为酶的辅基。随后相继发现有的葡萄糖脱氢酶(GDH)、乙醇脱氢酶(EDH)等的辅基也为PQQ(表1)。到90年代初,又发现两种可作辅基的醌类化合物,即6-羟基多巴醌和色氨酸-色氨酸醌^[2],并把以这类化合物作辅基的酶统称为醌蛋白(quinoproteins)。鉴于PQQ发现较早,80年代对其在生物界的分布、检测,以及纯化、性质等方面已进行了广泛研究。在这方面,国内也有专文介绍^[3]。

目前认为,PQQ在氧化还原酶中是继NAD(P)、FAD(FMN)之后的一种新辅基^[4],对其研究已日益受到重视。近年来,PQQ的生物合成、分子遗传、生物学特性及其应用已成为研究热点。本文拟就这几方面的研究成果作一概述。

1 PQQ的生物合成

自从PQQ的化学结构被阐明以来^[1],国外一些学者便开始研究人工合成的方法。1981年,Corey和Tramontano^[5]发表的PQQ合成方法,大致包括10步,

国家自然科学基金资助项目

•通讯联系人

1996-01-29收稿

收得率约 20%。经改进后的某些方法曾被用于生产 PQQ。但总的看来,化学方法有步骤繁杂、收得率低、副产物多和后处理困难等弊端。因而,生物合成方法倍受重视。

虽然已有报道^[6],PQQ 广泛存在于细菌、植物和动物等生物体中。但目前仅证实一些革兰氏阴性细菌可合成 PQQ(表 1)。另外,自然界还存在一些细菌仅合成醌蛋白的酶蛋白部分,而不合成辅基 PQQ。当在基质中加入 PQQ 后,可组合为有活性的全酶。它们包括: *Pseudomonas testosteroni* 的醇脱氢酶 (ADH), *Escherichia coli* 和 *Klebsiella pneumoniae* 的 GDH, 以及 *Acinetobacter lwoffii* 的 GDH 和五小叶脱氢酶 (QDH), 还有 *Pseudomonas* sp. VM15C 的聚乙烯醇 (PVA) 脱氢酶 (PVDH) 等。

表1 产生PQQ细菌及其对应的醌蛋白

醌蛋白	所属细菌
甲醇脱氢酶	<i>Acetobacter methanolicus</i> <i>Methylotrophs</i>
乙醇脱氢酶	<i>Pseudomonas aeruginase</i>
醇脱氢酶	<i>Pseudomonas</i> , <i>Gluconobacter</i> , <i>Acetobacter</i>
葡萄糖脱氢酶	<i>Acetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i> <i>Pseudomonas</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Escherichia Coli</i> PTS ⁻
五小叶脱氢酶	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
聚乙烯醇脱氢酶	<i>Pseudomonas</i>
聚乙二醇脱氢酶	<i>Flavobacterium</i>
甘油脱氢酶	<i>Gluconobacter</i>
羽扇烧宁羟化酶	<i>Pseudomonas lupanini</i>
山梨(糖)醇脱氢酶	<i>Gluconobacter suboxydans</i>

PQQ 的生物合成始于 1984 年,当时 Ameyama 等^[7]用甲基营养菌 (*Methylotrophs*) 作供试菌株,以甲醇作唯一碳源,在液体培养基中恒温培养 2d 后, PQQ 产量超过 10 μ g / ml。翌年, Adachi 等^[4]用同类细菌进行糖原发酵,培养 150h 后, PQQ 产量达 150 μ g / ml。1986 年, Urakami 等^[4]用甲醇、甲胺作为碳、氮源进行 PQQ 发酵,其产量达到同等水平。后来的报道,通过调节和控制培养基中无机盐成分, PQQ 产量可以达到 600 μ g / ml。1992 年, Urakami 等^[8]以生丝微菌 (*Hyphomicrobium* sp.)

TKO441 作生产菌株,建立了用瓶状发酵罐生产 PQQ 的一种适当程序,其培养基中包含微量元素、Fe²⁺ (1 μ g / ml)、Mg²⁺ (150 μ g / ml) 等,仍以甲醇为碳源。在此培养基上, PQQ 产量可达 1mg / ml,而杂蛋白含量较少。

总结影响 PQQ 生物合成的因素^[4,7-9],可以概括为以下几方面:

1.1 筛选高产菌株是 PQQ 生物合成的前提。研究发现,多数甲基营养菌是 PQQ 的高产菌株。这类菌在以甲醇为碳源时,其代谢该物的第一步反应所需酶是以 PQQ 为辅基的 MDH,当培养进入指数末期或稳定期前期时,细菌开始分泌 PQQ (此时培养基中的甲醇已所剩无几);当进入稳定后期时, PQQ 的累积量达到最大。若维持其生长始终处于指数初期,则将使胞外 PQQ 浓度始终保持在一个基础水平上。这可能是由于在指数生长期细菌代谢甲醇时,离不开 MDH 的缘故;而到指数后期时,甲醇已快耗尽, MDH 不再为细菌生存所必需,所以这时该酶就容易丧失活性,并解离出 PQQ。

1.2 供试菌若不产生脱辅基酶蛋白,就不会合成 PQQ。但,酶蛋白与 PQQ 二者之间合成的依赖性并不紧密。因为有的细菌仅产生酶蛋白部分;有的细菌则可产生过量的 PQQ (相对酶蛋白的量而言),并分泌到胞外。这类细菌有利于 PQQ 的发酵生产;还有的细菌仅产生很少量的 PQQ。例如分批培养 *Ps. putida* 时,就只产生很少量的 PQQ,在细胞抽提物中, GDH 的酶蛋白仅有 25% 能构成全酶 (PQQ-GDH),即可证明这点。

1.3 有的细菌产生醌酶蛋白及其辅基 PQQ 时,并非必须有醌酶蛋白的底物存在。但是当所用碳源并非醌酶蛋白合成的诱导物时,一般 PQQ 合成率则较低。Urakami 等^[8]用生丝微菌 TKO441 发酵时,发现 Fe²⁺ 浓度会影响 PQQ 产量。当适当减少液体培养基中 Fe²⁺ 含量时,培养液内的 PQQ 含量和细胞中的 MDH 活性均可增高。另外,增加培养基中的 Mg²⁺ 含量,培养液中杂蛋白产量会减少,对 PQQ 提纯有利。

1.4 在培养细菌初期,若加入少量 PQQ 时,会促进 PQQ 的产生。例如 *Ps. putida*, *Acinetobacter calcoaceticus* 和 *Hyphomicrobium* X 即如此。但在乙醇培养基中加入 PQQ 培养 *Ps. stutzeri* LMD 26.48 时, PQQ 的合成却明显减少。

2 PQQ 生物合成的遗传学基础

要想提高 PQQ 生物合成量,了解其前体、途径和遗

传学基础无疑是有益的。试验表明^[10], PQQ生物合成的前体为酪氨酸(Tyr)和谷氨酸(Glu)。同位素标记分析证明, Tyr的酚环可形成PQQ的邻位醌结构。关于PQQ生物合成的详细途径目前还不清楚。

通过诱变手段可以得到丧失合成PQQ能力的突变株, 然后用功能互补方法测定生物合成互补群。这一方法的应用, 对于从基因水平认识PQQ的生物合成很有帮助。下面扼要介绍四种细菌的研究进展^[11~17]。

*A. calcoaceticus*的PQQ基因已被分离和测序^[11], 四个pqq基因位于一个5085bp的DNA片断上。将该片断导入PQQ突变体*A. lwoffii*和*E. coli* K-12后, 宿主菌可产生PQQ。这四个基因顺序为pqqIV-I-II-III, 在pqqIV与pqqI之间存在一个附加的开放阅读框(pqqV), 它与PQQ合成无关。另外, 在pqqIV上游有一个开放阅读框(Orf L), 在pqqIII下游有一个开放阅读框(Orf R), 但二者并非PQQ合成基因。四个pqq基因中, pqqI、II、III分别编码的蛋白质分子量为29700、10800、43600u, 但其功能尚不清楚。pqqIV编码一个含24个氨基酸的多肽, 该多肽的16与20位点分别为Glu与Tyr残基, 经这两处的基因点突变分析表明, 它们是PQQ生物合成的前体^[12]。这也说明pqqIV在PQQ生物合成方面是重要的。

*Klebsiella pneumoniae*的pqq基因位于一个已被克隆的含6940bp的DNA片断上, 含6个基因, 顺序为pqqA'、B'、C'、D'、E'、F', 分别编码的多肽分子量为2764(23个氨基酸)、33464、28986、10436、42881、83616u, 在pqqA'上游有一开放阅读框(orf X)(与PQQ合成无关^[13])。

Methylobacterium organophilum DSM760的六个pqq基因也已被克隆, 顺序为pqq-A-B-C-D-E-F。其中pqqA-D克隆于一个3.9kb的DNA片断中, pqqD包含在一个约0.1kb的DNA片断上, pqqF与pqqE相距19kb, 并且发现在pqqD与pqqC之间有一个pqqG基因, 但不参与PQQ的生物合成^[14]。

M. extorquens AM1合成PQQ需要七个基因参与, 它们分成两个基因簇: pqqDGCBA和PqqEF, 两者相距至少18kb^[15, 16]。其中PqqD基因编码一个含29个氨基酸的多肽(内含PQQ生物合成的前体Try和Glu)。最近研究表明, PqqD基因的转录起始位点位于PqqD基因上游95bp处^[17]。

研究者们还进一步比较了上述四种菌所含Pqq基因的相关性^[13, 15]: *K. pneumoniae*的PqqA'→E'基因产物与*A. calcoaceticus*的PqqIV、V、I、II、III的对应基因产物有40%~64%的同源性。氨基酸序列分析表明, *M. extorquens* AM1、*M. organophilum* DSM760的前三个基因PqqD、G、C分别与上述两种菌的PqqIV(A')、V(B')、I(C')相关。另外, PqqG基因是AM1菌合成PQQ所必需的, 而对DSM760菌来说, 却毫无关系。

研究PQQ的分子遗传学, 对阐明其生物合成机理, 构建高产菌株具有重要意义。目前用于PQQ发酵生产的微生物均为天然菌株。而参与微生物合成PQQ全过程所需的几个基因, 又往往与酶蛋白的产生相关联, 因而想用简单的常规方法大幅度提高PQQ的产量, 看来是困难的。近来, 学者们从研究PQQ生物合成的遗传调控机理入手, 通过运用基因工程方法, 改变原始菌株的遗传性状, 进而构建“超级菌株”的实践, 可能是提高PQQ发酵水平的一个重要途径^[18]。

3 PQQ的生物学特性及其应用

3.1 PQQ的生物学特性: 了解PQQ的生物学特性有助于揭示其在医学等方面的应用前景。概括其生物学特性(或者说是应用)大致有以下三方面:

(1) 作为酶的辅基参与生命活动(表1);

(2) 作为生长因子或维生素。PQQ不仅可作为某些细菌酶的辅基, 而且还可作为有些细菌的生长因子^[4]。这包括两种情况: 一是细菌本身产生PQQ, 在开始往培养基中加入外源PQQ时, 可明显缩短迟缓期, 但并不影响指数期生长率和在稳定期的细胞总量。如醋酸细菌进行已酸发酵时, 即是如此; 二是有些细菌仅产生脱辅基的酶蛋白, 当加入PQQ后, 这类菌便可在相应的底物上生长。如降解PVA的假单胞菌VMI5C本身仅产生PVDH的蛋白, 只有外加PQQ后, 才能构成有活力的全酶。

另外, 在哺乳动物中, PQQ及其甘氨酸加成物(OPQ)也显示出重要的生物学功能。例如它们可促进人成纤维细胞DNA的合成^[20]。把融合的人成纤维细胞置含^[3H]dT的培养基中培养24h后, 当PQQ浓度在0.003~30μmol/L时, dT掺入细胞的速度是随PQQ浓度的增高而加快。但当PQQ浓度提高到750~

1500 $\mu\text{mol/L}$ 时,dT掺入速度却显著降低。另外,当在培养基中加入0.003~3 $\mu\text{mol/L}$ OPQ时,并不影响DNA的合成,而当浓度增至15~750 $\mu\text{mol/L}$ 时,却可轻微促进其合成。

又如,PQQ和/或OPQ还可促进鼠神经生长因子(NGF)的增加^[19],促进幼鼠的生长,并提高存活率^[23]。PQQ也可促进鸡胚中胆绿素的分泌^[21]。在研究N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体时发现,PQQ可作用于鼠NMDA受体的一个氧化还原位点,调节NMDA的活性,进而起到保护大脑皮质神经细胞的作用^[22]。再者是,当鸡胚接触皮质醇后,PQQ可防止白内障形成和肝色素沉着^[2]。PQQ还可防止一些毒物(如 CCl_4)对肝脏的伤害。

(3) 参与非酶系统的氧化还原反应。PQQ有抗氧化、清除自由基的功效。例如PQQ可与牛红细胞黄素还原酶作用产生 PQQH_2 ,该物可还原处于更高氧化状态的血红素蛋白以及 O_2 。显然,PQQ可以作为动物组织的保护剂^[24]。PQQ还能催化氧化硫氧还蛋白和磷酸核酮糖激酶的-SH基因,从而使二者失活^[25]。

3.2 PQQ在生物传感器方面的应用 由于PQQ对氧不敏感,在pH变化时较稳定,因此将以PQQ作辅基的酶制品应用于生物传感器方面前景良好。目前已应用于此领域的醌蛋白有GDH、MDH及某些细菌的ADH。例如Ye Ling等^[26]研制的介体GDH电极传感器就使用了醌蛋白。当底物葡萄糖浓度达70mmol/L时,响应电流密度可达1.8mAcm⁻²。而在类似反应条件下,葡萄糖氧化酶电极传感器的最大电流密度为0.66mAcm⁻²。

PQQ可氧化NAD(P)H生成NAD(P)^[27]。近年来,Willner等^[28]以PQQ为介体,研制成以NADP为辅基的苹果酸脱氢酶电极装置,用于检测苹果酸效果良好。

综上所述,可以看出,对PQQ生物合成的遗传学研究还处在起步阶段,对一些基因的结构、功能还了解较少。但随着研究的不断深入,有些问题将会逐步弄清,对PQQ生物合成途径也将会从本质上得到认识。另外,鉴于PQQ广泛存在于生物界,加之目前的研究已显示出重要的生物学意义,因此可以预见,PQQ在实践中的应用潜力不容低估。

致谢 本文承武汉大学生命科学院赵永芳教授审阅,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Salishury S A, Forrest H S, Cruse W B T *et al.* *Nature*, 1979, **280**(5725): 843~844.
- [2] Klinman J P, Mu D. *Annu Rev Biochem*, 1994, **63**: 299~344.
- [3] 张经纬, 赵永芳. 生物化学与生物物理进展, 1995, **22**(1): 22~26
- [4] Arneyama M, Matsushita K, Shinagawa E, *et al.* *Vita and Horm*. 1991, **46**: 229~270.
- [5] Corey E J, Tramontano A J *Am Chem Soc*, 1981, **103**(18): 5590~5600.
- [6] Kumazawa T, Sato K, Seno H *et al.* *Biochem J*, 1995, **307**: 331~333.
- [7] Arneyama M, Hayashi M, Matsushita K *et al.* *Agric Biol Chem*, 1984, **48**(2): 561~565.
- [8] Urakami T, Kazuga Y. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(12): 3970~3976.
- [9] Van Kleef M A G, Duine J A. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**(5): 1209~1213.
- [10] Houck D R, John L H, Clifford J U. *J Am Chem Soc*, 1991, **113**(18): 3162~3166.
- [11] Goosen N, Horsman H P A, Huinen R G M *et al.* *J Bacteriol*, 1989, **171**: 447~455.
- [12] Goosen N, Huinen R G M, Putte P V J *Bacteriol*, 1992, **174**(4): 1426~1427.
- [13] Meulenbergh J M, Sellink E, Riegnan N H *et al.* *Mol Gen Genet*, 1992, **232**: 284~294.
- [14] Biville F, Turlin E, Gasser F. *J Gen Microbiol*, 1989, **135**: 2917~2929.
- [15] Morris C J, Biville F, Turlin E *et al.* *J Bacteriol*, 1994, **176**(6): 1746~1755.
- [16] Lidstrom M E, Anthony C, Biville F *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1994, **117**: 103~106.
- [17] Ramamoorthi R, Lidstrom M E. *J Bacteriol*, 1994, **177**: 206~211.
- [18] Biville F, Evelynne T, Francis G. *J Gen Microbiol*, 1991, **137**(8): 1775~1782.
- [19] Yamaguchi K, Sasano A, Urakami T *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1993, **57**(7): 1231~1233.
- [20] Yasuhisa N, Kumatawa T, Kino I *et al.* *Life Sci*, 1993, **52**(24): 1909~1915.
- [21] Hideo N, Ishida O, Ogiharau meda I, *et al.* *Life Sci*, 1993, **52**(3): 305~312.
- [22] Aizenman E, Jensen F E, Gallop P M *et al.* *Neurosci Lett*, 1994, **168**(1~2): 189~192.
- [23] Steinberg F M, Gershuin M E, Rucker R B. *J. Nutr*, 1994, **124**(5): 744~753.

- [24] Shiafer M, Massey V, Hultquist D E. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 193(1): 434~439.
- [25] Joohong P, Chuchich J E. Biofactors, 1992, 3(4): 257~260.
- [26] Ye Ling, Hämmerle M, Olsthoorn A J. J Anal Chem, 1993, 65: 238~241.
- [27] Itoh S, Kinugawa M, Mita N *et al*, J Chem Soc Chem Commun, 1989, 694~695.
- [28] Willner I, Riklin A. Anal Chem, 1994, 66, 1535~1539.