

## S-腺苷甲硫氨酸合成酶对埃博霉素生物合成的影响

李世旭 赵林 秦春晶 王晓娜 刘新利\*

(齐鲁工业大学 山东省微生物工程重点实验室 山东 济南 250353)

**摘要:**【目的】研究 S-腺苷甲硫氨酸合成酶(SAMs)对埃博霉素生物合成的影响。【方法】通过向发酵培养基中添加抑制剂和促进剂,比较分析纤维堆囊菌中 SAMs 的活性变化以及埃博霉素的产量变化。【结果】在埃博霉素的合成期, SAMs 的活性较高。加入抑制剂吲哚乙酸(IAA)之后, SAMs 的活性和埃博霉素的产量都不同程度的降低,而加入促进剂对甲苯磺酸钠(p-TSA-Na)之后, SAMs 的活性和埃博霉素的产量在不同程度上都有提高。在纤维堆囊菌的次级代谢中, SAMs 活性与埃博霉素的生物合成量呈正相关。【结论】S-腺苷甲硫氨酸合成酶在纤维堆囊菌的埃博霉素生物合成过程中发挥了重要的作用。

**关键词:** S-腺苷甲硫氨酸合成酶, 埃博霉素, 生物合成

## Influence of S-adenosylmethionine synthetase on epothilone biosynthesis

LI Shi-Xu ZHAO Lin QIN Chun-Jing WANG Xiao-Na LIU Xin-Li\*

(Shandong Provincial Key Laboratory of Microbial Engineering, Qilu University of Technology, Jinan, Shandong 250353, China)

**Abstract:** [Objective] To study the relationship between S-adenosylmethionine synthetase (SAMs) activity and the biosynthesis of epothilone. [Methods] We analyzed the relationship between the activities of SAMs and the yields of epothilone by the addition of inhibitor and accelerator. [Results] SAMs showed high activities in the period of the biosynthesis of epothilone. SAMs activities and the yields of epothilones both reduced with the indole-3-acetic acid addition and increased with the sodium p-toluenesulfonate addition. The SAMs activities were positive correlated with the yields of epothilone when the inhibitor or accelerator was added. [Conclusion] SAMs play an important role in the biosynthesis of epothilone in *Sorangium cellulosum*.

**Keywords:** S-adenosylmethionine synthetase, Epothilone, Biosynthesis

埃博霉素(Epothilone)是一类由纤维堆囊菌(*Sorangium cellulosum*)产生的大环内酯类抗肿瘤活性物质。它和紫杉醇一样都能抑制微管解聚,从

而抑制肿瘤细胞的生长,其简单的分子结构、良好的水溶性以及毒副作用小等优点使得埃博霉素成为抗癌药物的新研究热点<sup>[1]</sup>。过去的研究已经证明

基金项目: 山东省科技发展计划项目(No. 2012GSF12107); 国家自然科学基金项目(No. 21272139)

\*通讯作者: Tel: 86-531-89631776; 信箱: vip.lxl@163.com

收稿日期: 2013-02-12; 接受日期: 2013-04-10; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

埃博霉素是由底物丙二酰 CoA、甲基丙二酰 CoA、半胱氨酸以及腺苷甲硫氨酸经 PKS 聚酮合成酶合成<sup>[2]</sup>,其中腺苷甲硫氨酸(SAM)提供了埃博霉素 C4 位甲基<sup>[3]</sup>(图 1)。SAM 是生物体内重要的甲基提供者<sup>[4]</sup>,在次级代谢中发挥着重要的作用。目前已知的 SAM 唯一的胞内合成途径是由甲硫氨酸和 ATP 经 S-腺苷甲硫氨酸合成酶(SAMs)催化合成<sup>[5]</sup>。SAMs 广泛的存在于动植物以及微生物中,并且已经从多种来源中得到纯化<sup>[6]</sup>。有研究表明吲哚乙酸(IAA)能够抑制 SAMs 的活性<sup>[7]</sup>,对甲苯磺酸钠(p-TSA-Na)能够解除 SAM 对 SAMs 的反馈抑制从而促进酶促反应<sup>[8]</sup>。

已有研究证明,在抗生素的生物合成中,过量表达 SAMs 基因片段能够提高新生霉素<sup>[9]</sup>和红霉素<sup>[10]</sup>的产量,其中向培养基中添加 SAM 促进了红霉素的合成,而对新生霉素的合成没有显著作用。本实验室的前期研究中发现,向培养基中添加甲硫氨酸并不能理想的促进埃博霉素的产量,于是本研究从 SAMs 活性的角度探讨埃博霉素生物合成前体 SAM 的来源,并通过向培养基中添加抑制剂和促进剂进一步研究 SAMs 对埃博霉素合成的影响,这也是首次通过添加酶活调节剂的

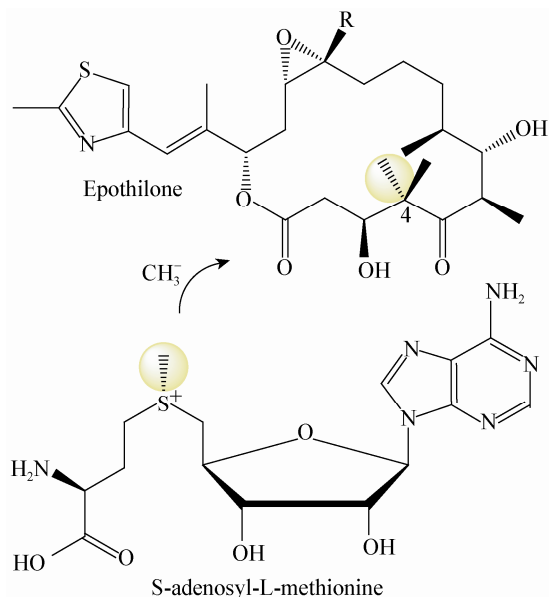


图 1 在埃博霉素合成中 SAM 提供 C4 位甲基  
Figure 1 SAM offer methyl of C4 in epothilone biosynthesis

方法来研究 SAMs 与埃博霉素生物合成的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和培养基

本研究中所用纤维堆囊菌 *Sorangium cellulosum* Soce2161 由本实验室保藏。

种子培养采用 M26 培养基(g/L):马铃薯淀粉 8,大豆蛋白胨 2,葡萄糖 2,酵母膏 2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,无水  $\text{CaCl}_2$  1,微量元素 1 mL, pH 7.2,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。

摇瓶发酵培养基(g/L):马铃薯淀粉 4.0,葡萄糖 2.0,豆饼粉 2.0,玉米浆 2 mL,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.0,微量元素<sup>[11]</sup> 1 mL, EDTA-Fe 溶液 0.08 mL,添加 1%的 XAD-16 树脂以吸附产物, pH 7.2,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。

### 1.2 菌体培养

1.2.1 种子培养:取摇瓶培养的对数期菌体,弃去大部分培养液,将剩余液体和菌体合并倒入含玻璃珠及转子的锥形瓶内。将锥形瓶置于磁力搅拌器打散菌体约 10 min,接种至 M26 培养基,于摇床 30 °C、130 r/min 振荡培养至对数期。

1.2.2 发酵培养:定量接种对数期菌种至发酵培养基,于摇床 30 °C、130 r/min 振荡发酵约 7 d。抑制剂 IAA 溶于 DMSO、促进剂 p-TSA-Na 溶于水后分别经微孔滤膜过滤除菌,添加量是 50  $\mu\text{L}$ ,对照样不加添加剂。

### 1.3 粗酶提取

收集自然沉降菌体 0.5 mL,用 5 mL Tris-HCl 缓冲液(0.1 mol/L, pH 8.9)充分洗涤一次,7 500 r/min 离心 10 min,弃上清,分别用 5 mL Tris-HCl 缓冲液重新悬浮,冰浴超声破碎(3 s, 6 s, 工作 5 min),4 °C、11 000 r/min 离心 15 min,上清液即为粗酶液。

### 1.4 蛋白浓度测定

参照考马斯亮蓝法,以 BSA 为对照。

### 1.5 SAMs 活力测定

参照罗星等<sup>[12]</sup>的方法并加以优化,酶活反应

混合物: 50  $\mu\text{L}$  Tris-HCl (pH 8.9), 50  $\mu\text{L}$  离子盐 (0.1 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , KCl), 50  $\mu\text{L}$  GSH (80 mmol/L), 125  $\mu\text{L}$  ATP (2 mmol/L), 100  $\mu\text{L}$  L-Met (2 mmol/L), 200  $\mu\text{L}$  粗酶液, 50  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, 37  $^\circ\text{C}$  水浴反应 1 h 之后, 用 600  $\mu\text{L}$  20% 的高氯酸终止反应, 放于 4  $^\circ\text{C}$  静置 30 min 以上, 10 000 r/min 离心 15 min, 待液相分析。酶活对照用 250  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 代替 ATP 和 L-Met。定义 37  $^\circ\text{C}$  下 1 h 内产生 1  $\mu\text{mol}$  SAM 所需酶量为一个酶活力单位。

高效液相色谱分析反应生成物 SAM, 条件参照崔薇<sup>[13]</sup>并加以优化: 254 nm, 40  $^\circ\text{C}$ , 1 mL/min, C<sub>18</sub> 反向色谱柱(Thermo 250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相: 1.2 g/L 庚烷磺酸钠, 40 mmol/L 的磷酸二氢铵: 甲醇 95:5 (体积比, pH 7.0)。

## 1.6 发酵参数的测定

(1) 发酵液中残留还原糖的浓度: 由还原糖测定仪(山东省科学院生物中心, SGD-IV)测定, 表征菌体生长状况。

(2) 发酵液的 pH: 用 pH 仪(上海精密科学仪器有限公司, PHS-25)测定。

(3) 菌体干重(DCW): 将等量的干树脂分别处理, 向每瓶培养基分别加入处理后的树脂, 在发酵周期中每个条件下每隔 24 h 取三瓶发酵液分别抽滤, 烘干滤纸和滤出物(DCW= $W_{\text{总重量}}-W_{\text{滤纸重量}}-W_{\text{树脂重量}}$ )。

## 1.7 添加剂浓度的选择

为选择合理的添加剂浓度, 试验中设置促进剂 p-TSA-Na 的浓度分别为 1、4、8 mmol/L, 抑制剂 IAA 的浓度分别为 0.05、0.2、0.5 mmol/L。同时为排除 DMSO 对实验的影响, 以只添加 DMSO 为阴性对照, 保持接种量等其它条件一致, 于发酵第 5、6 天分析各条件下 SAMs 活性及还原糖浓度, 发酵结束后分析 DMSO 对埃博霉素产量的影响。

## 1.8 埃博霉素的产量分析

将抽滤后的树脂于 40  $^\circ\text{C}$  烘干后收集, 分别用 1 mL 甲醇萃取 12 h, 10 000 r/min 离心浸提液 10 min, 用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤上清液。HPLC 分析 Epothilone A、Epothilone B 的含量。

HPLC 条件参考文献[14]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 无添加剂时胞内 SAMs 酶活性与埃博霉素产量的关系

如图 2 所示, 在发酵前 3 天, SAMs 活力较低, 从发酵第 4 天, 酶活力开始提高, 同时埃博霉素也开始迅速合成, 在第 6 天时酶的比活力增长至最高 (0.63 U/mg), 之后到发酵结束时酶活力又有所降低。从图 2 中可以看出, 在发酵过程中, SAMs 活性与埃博霉素的生物合成存在一定的关联。

### 2.2 添加剂浓度的确定

根据图 2, 选择 SAMs 活力较高的发酵第 5、6 天测定不同添加剂浓度条件下的酶活力和还原糖浓度, 结果如表 1 所示。

从表 1 可以得出, 添加 50  $\mu\text{L}$  DMSO 对菌体的生长及 SAMs 活力基本上没有影响。添加 1 mmol/L p-TSA-Na 或 0.05 mmol/L IAA 对酶活力的影响不明显, 8 mmol/L p-TSA-Na 或 0.5 mmol/L IAA 虽能有效的改变酶活, 但对菌体的生长有较显著的影响, 而 4 mmol/L p-TSA-Na 和 0.2 mmol/L IAA 能影响酶的活力而又对菌体生长影响不大。因此, 选择 4 mmol/L p-TSA-Na 和 0.2 mmol/L IAA 进行进一步的实验。阴性对照试验中, DMSO 对埃博霉素产量的影响如图 3 所示, 50  $\mu\text{L}$  DMSO 的添加对埃博霉素的合成也没有明显的影响。

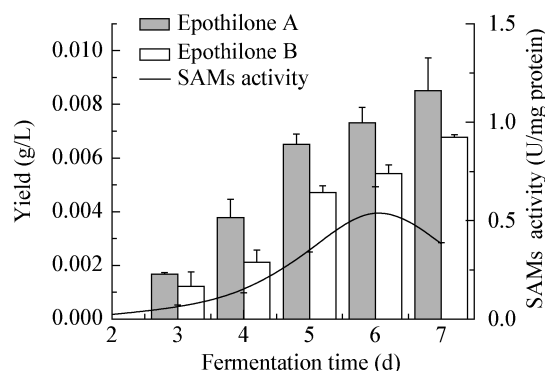


图 2 SAMs 活力与埃博霉素生物合成的关系

Figure 2 The relationship of SAMs activity and epothilone biosynthesis

表 1 还原糖的浓度及酶活力随添加剂浓度的变化  
Table 1 The changes of reducing sugar concentration and specific activity with different concentration of additives

	Fermentation time (d)	Control	DMSO	p-TSA-Na (mmol/L)			IAA (mmol/L)		
				1	4	8	0.05	0.2	0.5
还原糖浓度	5	0.08	0.09	0.07	0.07	0.06	0.08	0.09	0.18
Reducing sugar concentration (g/L)	6	0.05	0.04	0.04	0.04	0.02	0.05	0.06	0.13
酶活	5	0.04	0.04	0.04	0.05	0.06	0.04	0.03	0.02
Enzyme activity (U/mg protein)	6	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.05	0.03	0.03

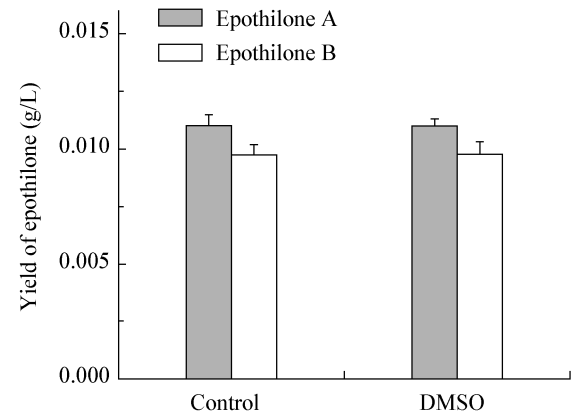


图 3 DMSO 对胞内埃博霉素产量的影响  
Figure 3 Effect of DMSO on epothilone production

2.3 添加剂对 SAMs 酶活、pH 及菌体干重的影响

发酵液中添加 p-TSA-Na 和 IAA 之后,胞内 SAMs 活性的变化如图 4 所示。加入 p-TSA-Na 之后,酶活明显高于对照,而在发酵过程中酶活力变化与对照是一致的。添加 IAA 后,SAMs 的活力显著下降,但不同于对照的是,在发酵第 4、5 天的活力略低于发酵第 3 天的活力。

为了全面地分析添加剂对酶活性及埃博霉素产量的影响,实验中对菌体的干重及发酵液的 pH 做了跟踪记录,分析数据平均值如图 5 所示。图 5A 显示在添加不同的添加剂条件下,添加剂对菌体干重并没有明显的影响。图 5B 显示,不同的添加剂对发酵过程的 pH 变化规律也没有影响。

2.4 添加剂对埃博霉素产量的影响

加入抑制剂和促进剂后,不同条件下埃博霉素的产量变化如图 6 所示,图 6A 显示在加入

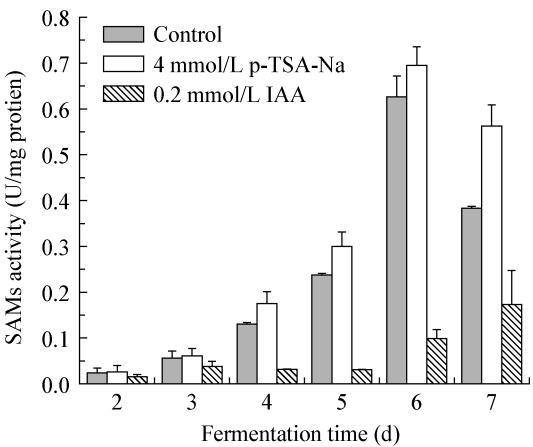


图 4 抑制剂和促进剂对胞内 SAMs 活力的影响  
Figure 4 Effect of inhibitor and accelerator on SAMs activity

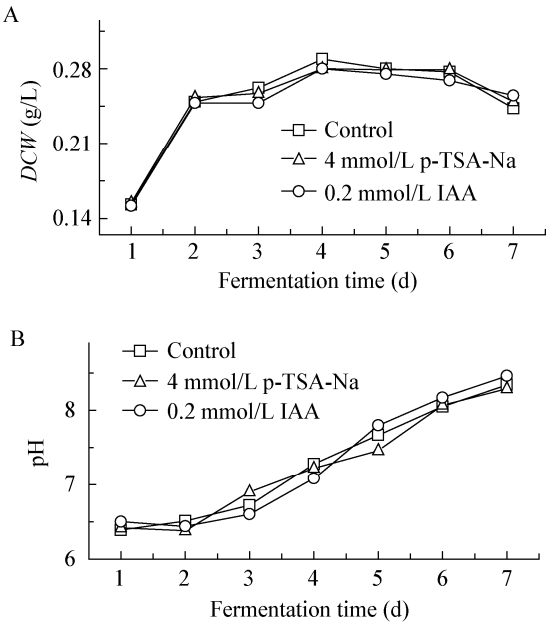


图 5 抑制剂和促进剂对菌体干重及发酵液 pH 的影响  
Figure 5 Effect of inhibitor and accelerator on dry cell weight and pH

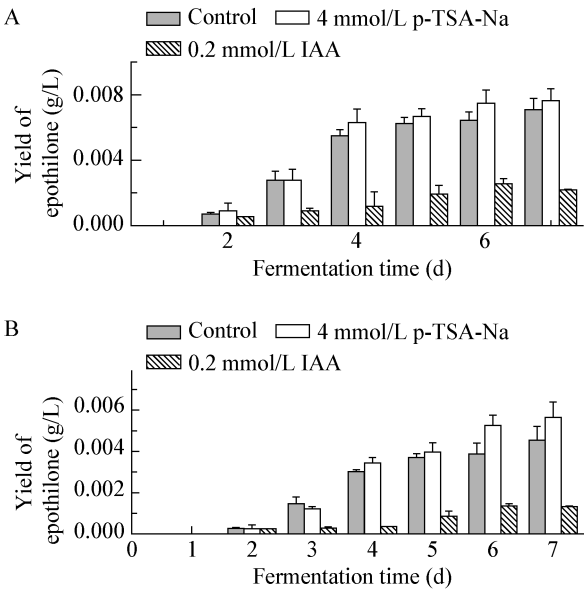


图 6 抑制剂和促进剂对埃博霉素产量的影响  
Figure 6 Effect of inhibitor and accelerator on epothilone production  
Note: A: Yield of epothilone A; B: Yield of epothilone B.

p-TSA-Na 之后，Epothilone A 的产量明显提高，IAA 使 Epothilone A 的产量大幅降低，图 6B 显示，Epothilone B 的产量也随促进剂的调节而升高，随抑制剂的作用而降低。这是因为在添加剂的调节作用下，SAMs 活性发生相应的改变，从而使埃博霉素的合成前体 SAM 在胞浆内的浓度相应的改变。结合图 4，发酵第 3、4 天埃博霉素快速积累，此时 SAMs 的活力并不是很高，而在第 6 天酶活力大幅上升，埃博霉素的合成量也达到顶峰。分析其原因，可能是在埃博霉素的初始积累阶段，其前体 SAM 由部分营养物质的分解供应，而在埃

博霉素的合成中后期，SAMs 途径就成为 SAM 的主要来源。

为了进一步分析添加剂对埃博霉素合成的影响，以无添加剂的对照实验中埃博霉素产量为 100%，分析了添加剂存在时单位质量菌体(DCW)埃博霉素的合成情况，结果如表 2 所示。

表 2 显示，促进剂 p-TSA-Na 从发酵第 3、4 天已经开始解除 SAMs 的产物抑制，对埃博霉素的合成发挥了促进作用，至发酵第 7 天 Epothilone A 和 Epothilone B 的相对值分别为 105.13% 和 121.63%；而加入抑制剂 IAA 后，从发酵第 3 天就已经发挥了强烈的抑制作用，至发酵结束 Epothilone A 和 Epothilone B 的相对值分别是 30.55% 和 28.86%。

3 结论

腺苷甲硫氨酸(SAM)是抗肿瘤化合物埃博霉素生物合成的一种必不可少的前体，在细胞内由 SAMs 催化合成。本研究通过向培养基中添加 SAMs 的促进剂 p-TSA-Na 和抑制剂 IAA 来分析 SAMs 活性和埃博霉素生物合成之间的关系，证明了 SAMs 活性与埃博霉素的生物合成量呈正相关，这表明 SAMs 在埃博霉素的生物合成中起到重要作用，而添加剂对菌体生长或发酵液 pH 都没有影响。这些研究不仅有助于揭示纤维堆囊菌中埃博霉素的生物合成机制，而且也有助于进一步通过对 SAMs 的分子改造提高埃博霉素产量，为新型大环内脂类药物埃博霉素的代谢调控提供新的思路。

表 2 抑制剂和促进剂对单位质量菌体埃博霉素合成的影响 Table 2 Effect of inhibitor and accelerator on epothilone biosynthesis in unit mass cell				
Fermentation time (d)	Epothilone A yield with p-TSA-Na (%)	Epothilone B yield with p-TSA-Na (%)	Epothilone A yield with IAA (%)	Epothilone B yield with IAA (%)
3	101.95	84.74	34.26	20.44
4	118.04	117.14	22.33	12.00
5	104.76	105.03	30.75	22.94
6	115.47	134.74	40.93	36.29
7	105.13	121.63	30.55	28.86

## 参 考 文 献

- [1] Hyesook H, Chung J, Kim J, et al. Isolation of *Sorangium cellulosum* carrying epothilone gene clusters[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18(8): 1416-1422.
- [2] Altmann KH, Höfle G, Müller R, et al. The Epothilones: An Outstanding Family of Anti-Tumor Agents[M]. New York: Springer Vienna, 2009: 29-50.
- [3] 王延亮, 张庆林. Epothilone 类构效关系及生物合成、转化的研究进展[J]. 国外医学药学分册, 2007, 34(1): 31-34.
- [4] Yoon S, Lee W, Kim M, et al. Structural and functional characterization of S-adenosylmethionine (SAM) synthetase from *Pichia ciferrii*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2012(35): 173-181.
- [5] Li XD, Xia B, Wang R, et al. Molecular cloning and characterization of S-adenosylmethionine synthetase gene from *Lycoris radiata*[J]. Molecular Biology Reports, 2013, 40(2): 1255-1263.
- [6] Zhou J, Chu J, Wang YH, et al. Purification and properties of *Saccharomyces cerevisiae* S-adenosylmethionine synthetase expressed in recombinant *Pichia pastoris*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(6): 789-796.
- [7] Lai JM, Wu LT, Chung JG, et al. All-trans-retinoic acid and indole-3-acetic acid inhibit methionine adenosyltransferase activity in human tumor cells[J]. Chinese Pharmaceutical Journal (Taipei), 1997, 49(2): 61-76.
- [8] 公剑, 王伟, 平和. S-腺苷甲硫氨酸合成酶及其在 S-腺苷甲硫氨酸合成中的应用[J]. 药物生物技术, 2001, 8(2): 108-111.
- [9] Zhao XQ, Gust B, Heide L. S-adenosylmethionine (SAM) and antibiotic biosynthesis: effect of external addition of SAM and of overexpression of SAM biosynthesis genes on novobiocin production in *Streptomyces*[J]. Archives of Microbiology, 2010, 192(4): 289-297.
- [10] Wang Y, Wang Y, Chu J, et al. Improved production of erythromycin A by expression of a heterologous gene encoding S-adenosylmethionine synthetase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 75(4): 837-842.
- [11] Park, Woo S, Choi S, et al. Enhanced production of epothilones by carbon sources in *Sorangium cellulosum*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 16(4): 519-523.
- [12] 罗星, 袁中, 罗贵民, 等. S-腺苷甲硫氨酸合成酶反应条件的优化[J]. 工业微生物, 2008, 38(2): 6-10.
- [13] 崔薇. S-腺苷甲硫氨酸合成酶及其应用研究[D]. 吉林: 吉林大学硕士学位论文, 2004.
- [14] Gong GL, Sun X, Liu XL, et al. Mutation and a high-throughput screening method for improving the production of epothilones of *Sorangium*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2007(34): 615-623.

## 征订启事

## 欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行人, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究, 农业微生物学研究, 工业微生物学研究, 医学微生物学研究, 食品微生物学研究, 环境微生物学研究, 微生物功能基因组研究, 微生物蛋白组学研究, 微生物模式菌株研究, 微生物工程与药物研究, 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国自然科学核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版, 由双月刊改为月刊, 发表周期缩短, 内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2014 年每册定价 58 元, 全年 696 元, 我们将免邮费寄刊。

邮购地址: (100101) 北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所 《微生物学通报》编辑部  
Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413