

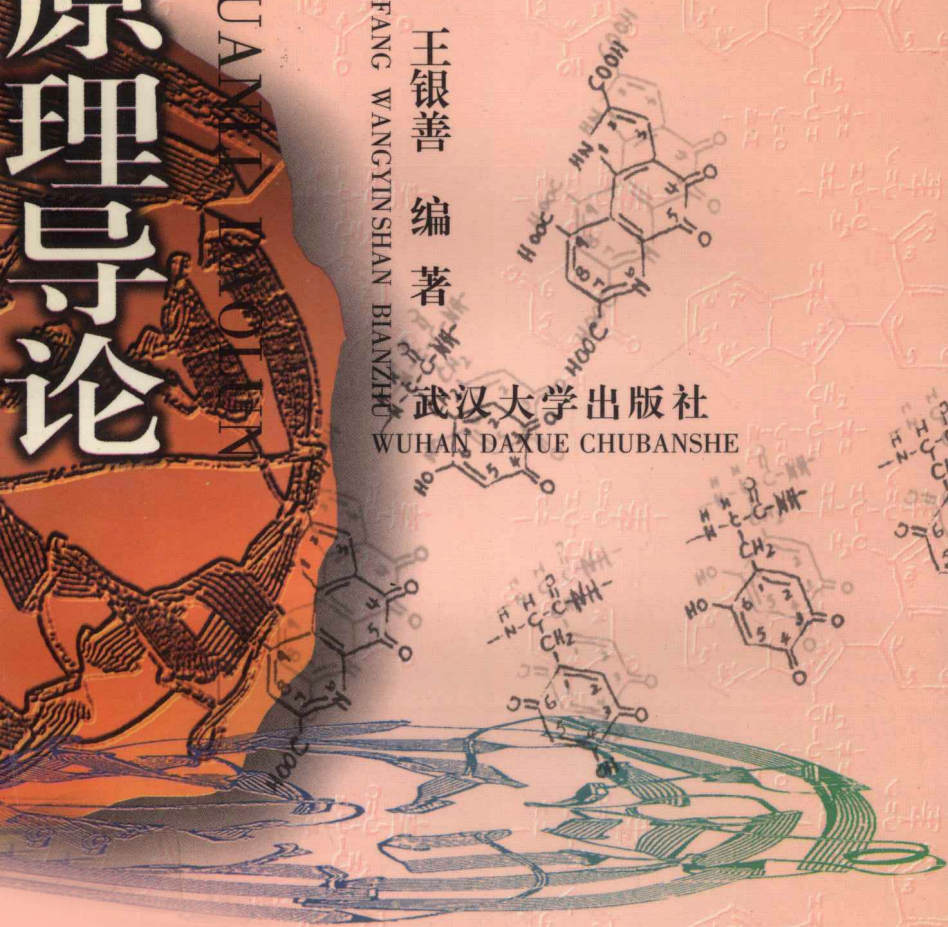
醌酶原理导论

KUNMEI YUANLI ZHIDUN

赵永芳 王银善 编著

ZHAOYONGFANG WANGYINSHAN BIANZHU

武汉大学出版社
WUHAN DAXUE CHUBANSHE



醌酶原理导论

赵永芳 王银善 编著

武汉大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

酞酶原理导论/赵永芳,王银善编著. —武汉:武汉大学出版社,
1998.3

ISBN 7-307-02553-1

I 酞…

II ①赵… ②王…

III 酞酶—理论

IV O625.46 Q55

武汉大学出版社出版发行

(430072 武昌 珞珈山)

武汉市汉桥印刷厂印刷

(430033 武汉市硚口区营南小区8号楼)

1998年3月第1版 1998年3月第1次印刷

开本: 850×1168 1/32 印张: 8.5

字数: 217千字 印数: 1—1000

ISBN 7-307-02553-1/O · 190 定价: 15.80元

本书如有印装质量问题, 请寄承印厂调换

内 容 简 介

本书以醌酶及其辅基的发现、进展和意义为主线,以含 PQQ 的甲醇脱氢酶、含 TTQ 的甲胺脱氢酶和含 TPQ 的铜胺氧化酶的纯化、性质和结构为重点,全面系统地介绍产生醌酶甲基营养菌的培养与特性、辅基 PQQ 的分离与鉴定,以及醌酶辅基合成的分子遗传,同时还概述了醌酶及其辅基的生物学功能与应用。全书共九章,每章后面附有主要参考文献。

本书可作为综合性大学、师范及医农院校本科生和研究生的教材,还可供从事生物化学、分子生物学工作的科研人员及其他有关同志参考。

前 言

醌酶(quinoenzyme)是以醌型化合物如吡咯喹啉醌(PQQ)、色氨酸-色氨酰醌(TTQ)和 6-羟基多巴醌(TPQ)作辅基的一类氧化还原酶的总称。80 年代以来,国际上对醌酶的研究一直比较活跃。随着 X-射线结晶衍射、核磁共振和 DNA 重组等技术的发展,学者们对这类酶的结构与功能的认识,已逐步接近事物的本质。例如,70 年代初,只知道革蓝氏阴性细菌代谢葡萄糖是通过双磷酸己糖酵解途径(EMP)进行的。但到 70 年代末,从这类细菌中发现了一种不同于 NAD^+ (或 NADP)和 FAD (或 FMN)的新辅基-PQQ 后,才认识到代谢葡萄糖的途径除 EMP 外,还有一条依赖于 PQQ 的葡萄糖脱氢酶催化葡萄糖转化到葡萄糖酸的途径;又如,广泛存在于原核生物和真核生物体内的铜胺氧化酶(可催化有机体内生成的有毒物质如腐胺等转化到过氧化氢和氨),15 年前曾以为其辅基是磷酸吡哆醛,事隔 5 年后认为是共价键结合的 PQQ,又过了 5 年,才最后确定为现在的 TPQ。对于催化甲胺转化的甲胺脱氢酶的辅基 TTQ 的认识,也有类似曲折的历程。

笔者从事醌酶研究始于 80 年代后期,当时筛选出一株能以聚乙烯醇(PVA,普通微生物难以代谢的一种人工合成物质)作唯一碳源和能源生长的共生细菌(symbiotic bacterium)SB₁。该菌由 *Pseudomonas* sp SB_{1r} 和 *Alcaligenes* sp SB_{1s} 组成,若将它们分别接种在 PVA 培养基时,二者均不生长或生长很差;若将它们混合接种于同样培养基时,则二者均生长旺盛。试验结果表明,这一现象的发生,是因代谢 PVA 的关键酶——PVA 脱氢酶的辅基 PQQ 和酶蛋白分别由两种细菌即 SB_{1r} 菌和 SB_{1s} 菌合成(通常复合酶的辅基和酶蛋白是由一种细菌合成)引起的。为将这方面的工作深入下去,在国家自然科学基金的资助下,我们于 90 年代

初,开展了新辅基 PQQ、TTQ 和 TPQ 及其相关酶类的纯化、性质与应用研究课题,并取得了不少有意义的阶段性成果。1996 年 10 月专程来武汉与我们进行学术交流的荷兰著名生物化学教授 Duine. J. A 博士(第一个醌酶辅基 PQQ 的发现者),曾对此给予充分肯定和评价。

根据上述情况,联系近几年研究工作中遇到的问题和学生们提出的有关建议,结合目前国内尚无此类教材和著作的实际,在以往给研究生授课过程编写的醌酶讲义基础上,我们撰写成这本较系统、且适合生化专业高年级学生和研究生使用的“醌酶原理导论”教科书。

本书主要论述醌酶的发现、进展和意义,产生醌酶甲基营养菌的培养及生物学性质,几种代表性醌酶及其辅基的纯化和鉴定、醌型辅基合成的分子遗传进展,以及 PQQ 的生物学功能与应用等内容。全书共分九章,书中穿插图表百余幅,每章后面附有主要参考文献,以便读者了解原始观点。

本书在编写和脱稿过程中,承中国科学院武汉病毒研究所前所长蔡宜权研究员审阅指正;承同行国内外学者 Duine. J. A 教授、Lidstrom. M. E 教授、Gallop. P. M 教授和陈曦教授惠赠资料,编著者表示衷心感谢。编著者并感谢本实验室的徐宁同志和研究生张经纬、肖华胜、刘建平、黄健、曹志方、成汇、丁远春、李志红、钞亚鹏、吴波、王冠芳、章骥、黄昆等,以及进修教师刘卫群同志为本书完稿所做的工作。同时还感谢陈宝联、王莉娟同志为该书绘制若干插图,王耘和王雨同志分别在出版经费、誊写校对等方面给予的支持。

由于水平和时间所限,加之涉及的知识面较广,因此书中定有不当和错漏之处,恳请读者随时指正,以便日后修改。

编著者

一九九七年元月

缩 写 词

PQQ	(pyrroloquinoline quinone) 吡咯喹啉醌
TPQ	(topaquinone) 6-羟基多巴醌
TTQ	(tryptophan tryptophylquinone) 色氨酸-色氨酰醌
NAD	(nicotinamide adenine dinucleotide) 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸
FAD	(flavin adenine dinucleotide) 黄素腺嘌呤二核苷酸
PLP	(pyridoxal phosphate) 磷酸吡哆醛
GDH	(glucose dehydrogenase) 葡萄糖脱氢酶
MDH	(methanol dehydrogenase) 甲醇脱氢酶
EDH	(ethanol dehydrogenase) 乙醇脱氢酶
AO	(amine oxidase) 胺氧化酶
CAO	(copper amine oxidase) 铜胺氧化酶
DAO	(diamine oxidase) 二胺氧化酶
BSAO	(bovine serum amine oxidase) 牛血清胺氧化酶
MADH	(methylamine dehydrogenase) 甲胺脱氢酶
AADH	(aromatic amine dehydrogenase) 芳香胺脱氢酶
PLAO	(phenylethyl amine oxidase) 苯乙基胺氧化酶
apo-GDH	(apo-glucose dehydrogenase) 脱辅基葡萄糖脱氢酶
BTB	(bromothymyl blue) 溴百里酚蓝
NBT	(nitroblue tetrazolium) 氮蓝四唑
PMS	(phenazine methosulfate) 吩嗪硫酸甲酯
PES	(phenazine ethylsulfate) 吩嗪硫酸乙酯
DCPIP	(2, 6-dichlorophenol indophenol) 2,6-二氯酚靛酚
ESR	(electron spin resonance) 电子自旋共振
NMR	(nucleon magnetic resonance) 核磁共振

RR	(resonance raman)	喇曼共振
GC	(gas chromatography)	气相色谱
HPLC	(high preformance liquid chromatography)	高效液 相色谱
MS	(mass spectrum)	质谱
Su	(sulfonamide)	磺胺
Tc	(tetracycline)	四环素
Km	(kanamycin)	卡那霉素
Ap	(ampicillin)	氨苄青霉素
Asp	(aspartic acid)	天冬氨酸
Asn	(asparagine)	天冬酰胺
Tyr	(tyrosine)	酪氨酸
Lys	(lysine)	赖氨酸
Glu	(glutamic acid)	谷氨酸
Gln	(glutamine)	谷氨酰胺
His	(histidine)	组氨酸
Thr	(threonine)	苏氨酸
Ser	(serine)	丝氨酸
Pro	(proline)	脯氨酸
Gly	(glycine)	甘氨酸
Ala	(alanine)	丙氨酸
Trp	(tryptophan(e))	色氨酸
Phe	(phenylalanine)	苯丙氨酸
Met	(methionine)	蛋氨酸
Leu	(leucine)	亮氨酸
Ile	(isoleucine)	异亮氨酸
Val	(valine)	缬氨酸
Arg	(arginine)	精氨酸
Cys	(cysteine)	半胱氨酸

目 录

第一章 醌酶简史	1
第一节 PQQ 的发现及分布	2
第二节 TPQ 的发现及分布	5
第三节 TTQ 的发现及分布	7
第四节 醌酶辅基的生物学意义	8
参考文献	11
第二章 产生醌酶的甲基营养菌	17
第一节 利用甲醇的细菌	18
一、概述	18
二、甲醇的代谢	20
第二节 转化甲基胺的细菌	22
一、甲基胺的代谢	23
二、甲醛的代谢	24
第三节 甲基营养菌的遗传性质与应用	30
一、遗传性质	30
二、合成单细胞蛋白	31
三、净化环境	35
参考文献	38
第三章 PQQ 的纯化及性质	44
第一节 纯化	44
一、由培养液纯化 PQQ	45
二、由酶或细胞纯化 PQQ	47
第二节 定性与定量分析	48

一、高效液相色谱法	48
二、生物检测法	50
三、非酶系统氧化还原循环法	53
四、免疫测定法	54
第三节 还原与水合	55
一、还原型 PQQ	56
二、氧化型与还原型 PQQ 的中点电位	59
三、水合型 PQQ	59
第四节 PQQ 的衍生物	60
一、PQQ 与醇的加成	60
二、PQQ 与尿素和氨的加成	61
三、PQQ 与醛、酮的加成	62
四、PQQ 与氨基酸的加成	62
参考文献	65
 第四章 甲醇脱氢酶与 PQQ	69
第一节 酶的纯化与鉴定	70
一、纯化	70
二、鉴定	73
第二节 酶的性质	75
一、辅基 PQQ	75
二、电子受体	76
三、底物专一性	82
四、激活剂与抑制剂	84
五、光谱特性	84
第三节 酶作用机理	84
一、催化循环	86
二、酶促反应	86
第四节 酶的结构	89
一、螺旋桨(propeller)结构	89
二、活性位点结构	91

三、酶蛋白的氨基酸序列	93
第五节 其它含 PQQ 的醌酶	97
一、醇脱氢酶	97
二、葡萄糖脱氢酶	98
三、用醌酶制作生物传感器	99
参考文献	100
 第五章 甲胺脱氢酶与 TTQ	106
第一节 酶的纯化	109
一、纯化程序	109
二、酶活性测定	113
三、酶活性染色	114
四、醌酶蛋白染色	114
第二节 酶的性质	115
一、稳定性	116
二、最适 pH	116
三、底物专一性	117
四、静电及免疫特性	117
五、光谱性质	118
第三节 酶的结构	122
一、一级结构	122
二、高级结构	124
三、酶基因及相关基因的结构	127
第四节 酶反应机制	128
一、还原反应	128
二、氧化反应	133
三、pH 和单价阳离子对酶促反应的影响	135
参考文献	138
 第六章 铜胺氧化酶与 TPQ	147
第一节 酶的纯化与鉴定	149

一、纯化	149
二、鉴定	150
第二节 酶的生物学特性	153
一、辅基的确定	153
二、光谱分析	156
三、化学性质	158
四、催化机制	158
第三节 辅基 TPQ	160
一、结构	160
二、生物合成	161
第四节 酶的结构	161
第五节 酶在保健和医药方面的应用	164
一、代谢调控方面	164
二、医药方面	165
参考文献	167
 第七章 微生物产生 PQQ	 174
第一节 PQQ 的生物合成	176
一、细菌合成 PQQ	176
二、PQQ 的合成前体	177
三、PQQ 的合成路线	179
第二节 影响 PQQ 合成的因子	180
一、菌种	180
二、碳源	182
三、亚铁(Fe^{2+})及镁(Mg^{2+})离子	183
四、外源 PQQ	185
五、氨基酸与氮源	186
六、微量元素与维生素	187
第三节 含 TTQ、TPQ 醌酶的生成	188
一、含 TTQ 的醌酶	188
二、含 TPQ 的醌酶	189

参考文献	192
------------	-----

第八章 醌酶辅基合成的分子遗传 198

第一节 部分 pqq 基因的分离与克隆 199

一、PQQ ⁻ 突变株的分离	199
二、基因库的构建	201
三、转化子与 PQQ ⁻ 突变株的结合	202
四、质粒的亚克隆	203
五、质粒 pSS2 的 pqq 基因图谱	204
六、pqq 基因的核苷酸顺序及定位	207
七、pqq 基因的表达	208

第二节 嗜有机甲基杆菌 PQQ 合成基因 209

一、DSM760 菌的诱变及 PQQ ⁻ 突变株的分离	210
二、与质粒 R ¹ 51 能互补突变株的遗传分析	212
三、与质粒 R ¹ 51 不能互补突变株的遗传分析	212

第三节 强制甲基杆菌 PQQ 合成基因 214

一、PQQ ⁻ 突变株的分离与互补类群的确定	214
二、突变株的生理特性	215
三、pqqDGCBA 基因及其部分核苷酸序列	216

第四节 肺炎杆菌 pqq 基因及其编码的蛋白 219

一、基因产物的确定	219
二、几种细菌 pqq 基因的比较	221
三、部分 pqq 基因的核苷酸序列	223
四、pqqF 基因及其它	224

第五节 TTQ 与 TPQ 的合成 225

一、TTQ	226
二、TPQ	227
参考文献	228

第九章 PQQ 的生物学功能与应用 233

第一节 刺激微生物和植物生长 234

第二节 PQQ 的营养价值	237
一、影响鼠的生长繁殖	238
二、促进胞外基质(matrix)成熟	239
三、提高免疫功能	240
第三节 清除自由基	240
一、释放嗜中性白细胞过氧化物	242
二、清除红细胞中过氧化物	243
第四节 促进神经细胞生长、防止乙醛中毒	248
一、促进神经细胞生长	248
二、防止乙醛中毒	249
参考文献	251

第一章 醌酶简史

醌酶(quinoenzymes)是一种氧化还原酶。氧化还原酶在酶学中占有极其重要的位置。它在生物体内主要参加催化氢离子(或原子)转移或电子传递过程,并多数伴随有能量获得或释放反应。而这类酶仅靠脱辅基的酶蛋白是没有催化活性的,只有相应的有机(或无机)辅基与其结合时才能显现出活性来。70年代以前,人们知道的有机辅基有两种,即烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)或烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP^+)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)或黄素单核苷酸(FMN)。它们与相关酶蛋白如何结合,结合后又如何参加生物体内的氧化还原反应等问题,可查阅有关著作^[1]。吡咯喹啉醌(pyrroloquinoline quione, PQQ)、6-羟基多巴醌(topaquinone, TPQ)和色氨酸-色氨酰醌(tryptophan-tryptophylquinone, TTQ)(见图 1-1)则是 80 年代以后相继发现的第三种新有机辅基^[1-3]。根据它们的光谱、质谱(mass spectrum, MS)和核磁共振谱(nuclear magnetic resonance, NMR)等性质,以及生物合成途径的研究结果,初步确定其均为氨基酸的衍生物,并且都含有一个共同的结构——邻位醌(氧化还原酶催化活性的关键部分),它们与酶蛋白结合的方式有非共价和共价型两种。按照依赖于 NAD(P) 和 FAD 氧化还原酶命名的习惯,同时也为强调新辅基与相应酶蛋白构成氧化还原酶的重要性和特殊意义,一种醌酶(quinoenzymes)、醌蛋白(quinoproteins)或 methoxatin 的称谓便应运而生^[4]。时至今日,已检测出的醌酶可分为三个类型即 I 型、II 型和 III 型,它们的辅基分别为 PQQ、TPQ 和 TTQ^[5-7](见图 1-1)。本章将扼要介绍醌酶或者说 PQQ、TPQ 和 TTQ 的研究简史、分布状况及应用价值。

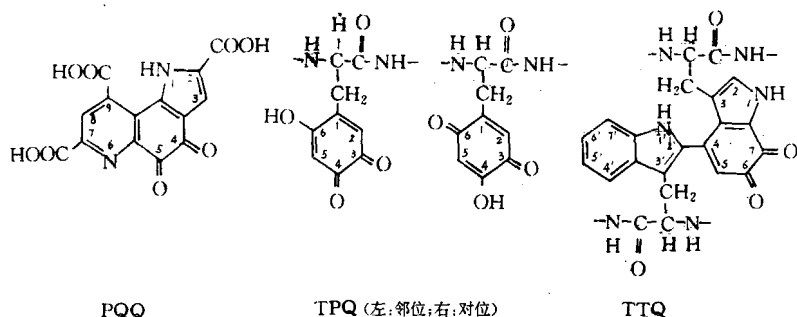


图 1-1 PQQ、TPQ 和 TTQ 的结构

第一节 PQQ 的发现及分布

一、PQQ 的发现

关于 PQQ 的第一个研究报告可追溯到 1959 年,在研究非磷酸化细菌的葡萄糖代谢(一般细菌代谢葡萄糖是通过葡萄糖-6-磷酸途径进行的)^[8]时,观察到乙酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*, 当时称 *Bacterium anitratum*)含有一种不依赖于 NAD(P) 和 FAD 的葡萄糖脱氢酶(glucose dehydrogenase, GDH)。随后 Hauge^[9]从此酶得到一种可分离的辅基,其最大吸收光谱在 248nm,台阶在 270~280nm(氧化型),并推断这个辅基可能是一个萘醌的衍生物。可惜的是,这一重要见解,长时间未引起注意。大约在同一时间,学者们对单细胞蛋白和生物多糖产生了兴趣,并着手研究细菌代谢甲醇的过程。期间发现了几种细菌能生长在以甲醇或甲烷作唯一碳源的培养基上。这一现象不仅促进了微生物酶学的发展,而且也刺激了生产厂商以甲基营养细菌(*methylophilic bacterium*)^[10]为生产菌株建立发酵工厂的积极

性。细菌(如 *Pseudomonas sp* M27)^[11]代谢甲醇的关键酶是甲醇脱氢酶(methanol dehydrogenase, MDH),研究此酶时,得到了如上述 GDH 一样可分离的有机辅基。该辅基既不是 NAD(P),也不是 FAD。Anthony 和 Zatman^[11]于 1967 年根据荧光光谱性质,提议该辅基可能是一个不普通的蝶啶(pteridine)化合物。此后的 10 年里,对该辅基的研究一直无甚进展。到 70 年代后期,Duine 等^[10,12]采用电子自旋共振(electrons spin resonance, ESR)、NMR 和 MS 等技术重新研究 MDH 的结构,于 1979 年提出,该酶的辅基不是蝶啶化合物,而是一个含两个 N 原子的醌型结构物质,并证明 Hauge 发现的 GDH 含有像 MDH 一样的醌型辅基^[13],与此同时,Salisbury 等^[10,14]通过 X-射线晶体衍射技术对该辅基的结晶丙酮加成物分析后,确定此辅基为三羧基吡咯喹啉醌结构。这与早期得到的邻位醌部分结果相吻合,于是认为其结构式是,4,5-二氢-4,5-二氧-1-氢-吡咯并(2,3-f)喹啉-2,7,9-三羧酸(见图 1-1),现在称 PQQ 或吡咯喹啉醌,早期人称 methoxatin。

PQQ 的发现是醌酶研究史上的一个重要事件。它不仅表明人们认识了一个新辅基,而且意味着酶学将出现一个新的分支。事实也是如此。继 MDH 之后,Ameyama 等^[15]又鉴定了葡萄糖杆菌(*Gluconobacter sp*)的 GDH 也属不依赖 NAD,而是以 PQQ 作辅基的酶类。接着还有几个以 PQQ、TPQ 和 TTQ 作辅基的细菌酶也被鉴定报道,详见表 1-1。

二、PQQ 的分布

80 年代以后,陆续报道依赖 PQQ 作辅基的酶是来自革蓝氏阴性(G^-)细菌。例如上面提到的 GDH 和 MDH 是分别来自乙酸钙不动杆菌^[16]和甲基营养菌(*methylophilic bacteria*)^[10],乙醇脱氢酶(ethanol dehydrogenase, EDH)^[17]和聚乙烯醇脱氢酶(polyvinyl alcohol dehydrogenase, PVDH)^[18]是来自假单胞菌(*Pseudomonas sp*),还有另一种 EDH(醌血红素蛋白细胞色素